

УДК 579.841.11.014.44+615.33.015.8

Карбапенемоустойчивые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах города Пермь

М.В. Кузнецова^{1,2}, Т.И. Карпунина², Д.О. Егорова¹,
Е.Г. Плотникова¹, В.А. Демаков¹¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

При изучении устойчивости к карбапенемам 178 штаммов *P. aeruginosa*, изолированных в стационарах Перми, выявлено, что подавляющее большинство резистентных культур выделено из реанимационных отделений хирургических стационаров. В учреждении родовспоможения и детском стационаре циркулируют преимущественно чувствительные к антибиотикам изоляты. Доля меропенемоустойчивых штаммов синегнойной палочки в целом составила 42,5%, имипенемоустойчивых – превысила половину. К обоим антибиотикам нечувствитель-

ны 32,4% штаммов *P. aeruginosa*. Продуценты металло-бета-лактамаз составили 19,1% всех изученных и 30,3% из карбапенемоустойчивых культур. Установлено, что в геноме данных штаммов присутствуют гены *bla*_{VIM-2}. Сравнительный анализ определенных аминокислотных последовательностей бета-лактамаз изученных штаммов позволил отнести их в группу VIM-2-подобных ферментов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемы, металло-бета-лактамазы.

Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Perm City Hospitals

M.V. Kuznetsova^{1,2}, T.I. Karpunina², D.O. Egorova¹, E.G. Plotnikova¹, V.A. Demakov¹¹ Institute of Microorganism Ecology and Genetics, Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia² Perm State Medical Academy named after E.A. Vagner, Perm, Russia

Analysis of susceptibility to carbapenems of *P. aeruginosa* (n=178) isolated in different Perm city hospitals showed that the majority of carbapenem-resistant strains were obtained from *intensive care units* (ICU) patients in surgical hospitals. The maternity hospital and the child hospital were dominated by isolates susceptible to this antimicrobial class. Overall proportion of meropenem-resistant *P. aeruginosa* isolates was 42.5%; imipenem-resistant isolates accounted for more than 50%. A total of 32.4% of strains were resistant to both meropenem and

imipenem concomitantly. Production of metallo-beta-lactamases was observed in 19.1% isolates (among all strains tested) or 30.3% isolates (among carbapenem-resistant strains). These strains were found to carry *bla*_{VIM-2} genes. Comparative analysis of several amino acid sequences of beta-lactamases showed that the enzymes belong to VIM-2-like group.

Key words: *P. aeruginosa*, carbapenems, metallo-beta-lactamase.

Контактный адрес:

Марина Валентиновна Кузнецова

Эл. почта: mar@iegm.ru

Введение

По данным исследований последнего десятилетия, все большее значение в этиологии внутрибольничных инфекций приобретают полирезистентные неферментирующие грамотрицательные бактерии и, прежде всего, *Pseudomonas aeruginosa* [1, 2]. Для лечения заболеваний, вызываемых этими бактериями, наряду с другими «антисинегнойными» препаратами, широко используются карбапенемы – меропенем и имипенем [3]. На протяжении длительного времени к этим антибиотикам было чувствительно подавляющее большинство клинических изолятов *P. aeruginosa*, включая госпитальные штаммы из отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [4–8]. Данные российских исследований последних лет свидетельствуют о росте встречаемости устойчивых к карбапенемам внутрибольничных штаммов *P. aeruginosa*, что становится серьезной проблемой клинической практики [9–12].

Наиболее распространенными механизмами резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa* являются: мутации или снижение экспрессии поринового белка OprD (преимущественно для имипенема), активное выведение антибиотика из клетки – эффлюкс-системы (преимущественно для меропенема и дорипенема) и ферментативная инактивация. Последний механизм может реализовываться с помощью карбапенемаз трех классов: металло-бета-лактамаз класса В (VIM, IMP и других групп), ферментами класса А (GES, KPC) и некоторыми ферментами класса D (OXA-50) [13, 14]. Преимущественная локализация генов, кодирующих металло-бета-лактамазы, в составе интег-

ронов, которые, в свою очередь, являются частью более крупных мобильных элементов, способствует их транслокации и, как следствие, широкому распространению [15–17].

Цель настоящего исследования – анализ распространенности и механизмов карбапенемоустойчивости культур *P. aeruginosa*, изолированных в крупных стационарах города Пермь.

Материал и методы исследований

Исследовано 178 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в 2008–2009 гг. от больных крупными хирургических, детского и акушерского стационаров города Пермь (табл. 1).

Идентификацию бактерий проводили согласно нормативным документам, регламентирующим работу бактериологических лабораторий [18, 19]. При определении антибиотикочувствительности оценку зон ингибирования роста бактерий осуществляли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [20]. Фенотипическую детекцию металло-бета-лактамаз у карбапенеморезистентных культур проводили методом радиальной диффузии с ЭДТА, добавляя 0,5 М ЭДТА в один из дисков [21]. Вывод о наличии карбапенемаз делался на основании разницы между величинами зон задержки роста культуры вокруг дисков.

ДНК получали следующим образом: полную пеллю биомассы бактериальной культуры инокулировали в 100 мкл стерильной воды, выдерживали при 95°C в течение 15 мин в твердотельном термостате «Термит» (Россия) [22]. Пробы охлаждали, центрифугировали 5 мин при 12 тыс. об/мин. Супернатант использовали в генетических исследова-

Таблица 1. Культуры *P. aeruginosa*, изолированные в различных лечебно-профилактических учреждениях Перми

ЛПУ	Отделение	Число штаммов
Городская клиническая больница (ГКБ)	Экстренной хирургии (ЭХО)	20
	Торакальное хирургическое (ТХО)	18
	Острой сердечно-сосудистой хирургии (ОССХ)	4
	ОРИТ	16
Краевая клиническая больница (ККБ)	ОРИТ	6
Институт сердца (ИС)	Реабилитационное (РО)	7
	ОРИТ	12
Лобановская клиническая больница (ЛКБ)	ОРИТ	8
	Родильный дом (РД)	36
Детская клиническая больница (ДКБ)	Отделение патологии	40
	ОРИТ	11
Всего		178

Таблица 2. Праймеры для ПЦР-анализа генов металло-бета-лактамаз

Фермент	Нуклеотидная последовательность	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Ссылка
VIM	F: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3' R: 5'-ATGAAAGTGCCTGGAGAC-3'	261	Tsakris A. et al., 2000 [4]
VIM-2	F: 5'-ATGTTCAAACSTTTTGAGTAAG-3' R: 5'-СТАСТСААСГАСТГАСГС-3'	801	Poirel L. et al., 2000 [23]
IMP-1	5'-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC-3' 5'-ACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'	587	Shibata N. et al., 2003 [24]

Таблица 3. Встречаемость карбапенемоустойчивых культур в стационарах города (n / %)

ЛПУ (число штаммов)	Меропенемоустойчивые (МУ)	Имипенемоустойчивые (ИУ)	МУ+ИУ	Карбапенемоустойчивые
ГКБ (58)	39/67,2	48/82,8	35/60,3	52/89,6
ККБ (6)	6/100	6/100	6/100	6/100
ИС (19)	5/26,3	16/84,2	5/26,3	16/84,2
ЛКБ (8)	4/50	8/87,5	4/50	8/100
РД (36)	3/8,3	6/16,6	3/8,3	6/16,6
ДКБ (51)	18/35,3	16/31,4	10/19,6	24/47,1
Всего (178)	75/42,5	100/56,2	63/35,4	112/62,9

Примечание. В группу «устойчивые» включены штаммы с промежуточной резистентностью.

дованиях. Скрининг генов металло-бета-лактамаз осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе Termocycler T3 (Biometra, Германия). Для амплификации внутренней «консервативной» последовательности генов ферментов группы VIM были использованы праймеры, предложенные А. Tsakris с соавт. (2000), для *bla*_{VIM-2}-гена – L. Poirel с соавт. (2000), для *bla*_{IMP}-гена – N. Shibata с соавт. (2003) (табл. 2).

Использованные в работе праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (г. Москва). ПЦР проводили согласно [25]: 2 мин – 95 °С; далее 30 циклов: 2 мин – 95 °С, 1 мин – 53 °С, 2 мин – 72 °С; 10 мин – 72 °С. Для обнаружения ПЦР-продуктов использовали электрофорез в горизонтальном агарозном геле (2%) при напряжении 8 В/см, при комнатной температуре. Агарозные гели окрашивали раствором этидия бромид (1–2 мкг/мл) в течение 5 мин и фотографировали в УФ-свете с помощью системы гельдокументирования BioDocAnalyze (Biometra, Германия). Для определения размеров фрагментов использовали следующие маркеры молекулярных масс: рUC19 ДНК/MspI (Силекс, Россия), О'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Нуклеотидные последовательности установлены с помощью набора реактивов DYEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBASE 1000 (JSC GE

«Healthcare», США) согласно рекомендациям производителя. Для секвенирующей ПЦР использовали те же праймеры, что и для наработки ампликонов. Предварительный анализ гена *bla*_{VIM-2} и «внутреннего» фрагмента генов *bla*_{VIM} проводили, используя программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных последовательностей проводили по базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Далее их анализировали с использованием программ CLUSTAL X 1.83 [26], TREECON version 1.3b [27]. Анализ первичной структуры белков осуществляли с помощью программы Vector NTI 10 (<http://www.catalog.invitrogen.com>). Поиск гомологичных последовательностей выполнен по банкам данных белков с использованием программ BLAST. Выравнивание аминокислотных последовательностей проведено с помощью программы CLUSTAL X 1.83.

Результаты и обсуждение

Установлено, что значительный процент культур *P. aeruginosa*, циркулирующих в лечебных стационарах города, составляли карбапенемоустойчивые штаммы (табл. 3).

Следует отметить, что этот показатель значительно варьировал в разных ЛПУ: от 16,6% в РД до 89,7% в ККБ, а все исследованные культуры, полученные из ОРИТ ККБ, ИС и ЛКБ, были устойчивы к карбапенемам. 100% устойчивость

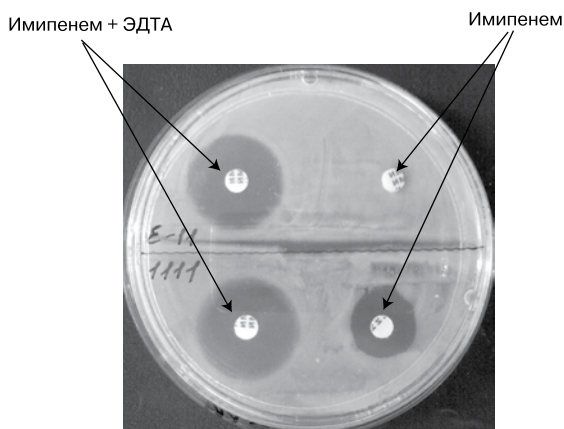


Рис. 1. Пример фенотипической детекции продуцентов металло-бета-лактамазы.

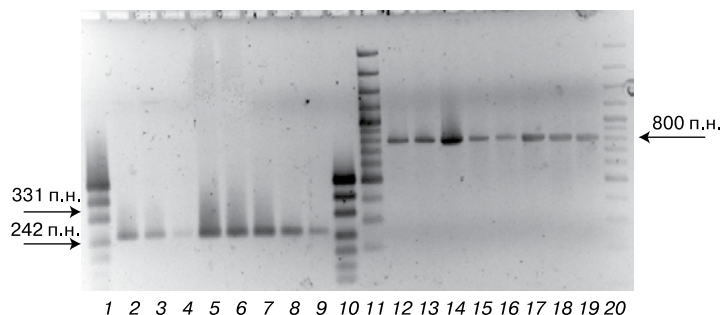


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации генов, кодирующих металло-бета-лактамазы, изолятов *Pseudomonas aeruginosa* из различных стационаров Перми: 1, 10 – маркер молекулярных масс рUC19 ДНК/MspI («Силекс», Россия); изоляты из ГКБ: 2, 12 – 1-13 (ОРИТ); 3, 13 – 129 (ЭХО); 4, 14 – 3-16 (ТХО); изоляты из ККБ: 5, 15 – 198 (ОРИТ); 6, 16 – 203 (ОРИТ); изоляты из ЛКБ: 7, 17 – 2ПЛ; 8, 18 – 31; 9, 19 – 60; 11, 20 – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва). Ампликоны размером 261 п.н. соответствуют внутреннему фрагменту генов ферментов группы VIM, фрагменты ДНК размером 801 п.н. – полному *bla*_{VIM-2}- гену.

изолятов к препаратам этой группы, по-видимому, объясняется небольшой выборкой штаммов, изолированных в короткий промежуток времени (возможно, вспышка внутрибольничной инфекции), и не может свидетельствовать об истинной распространенности резистентности к карбапенемам в данных стационарах. Доля меропенемоустойчивых штаммов синегнойной палочки в целом составила 42,5%, а имипенемоустойчивых превысила половину исследованных изолятов. Если к меропенему уровень резистентности оставался стабильным, на что указывает совпадение наших данных с результатами многоцентрового исследования «РЕЗОРТ», согласно которому 41,4% штаммов синегнойной

палочки, изолированных в ОРИТ ЛПУ России, были к нему нечувствительными [7], то в отношении имипенема прослеживается четкая тенденция нарастания устойчивости (56,2% против 39,0%).

В многопрофильном стационаре и к имипенему, и к меропенему были резистентны 60,3% штаммов *P. aeruginosa*. Из 48 имипенеморезистентных штаммов нечувствительными к меропенему были 72,9%, а из 39 штаммов, устойчивых к меропенему, нечувствительными к имипенему – 89,7%. Отсутствие абсолютной перекрестной устойчивости к двум наиболее часто используемым в клинике препаратам – имипенему и меропенему связано с особенностями приобретения резистентности *P. aeruginosa* к карбапенемам. Кроме того, возможно, что используемые подходы в оценке антибиотикочувствительности являются не идеальными, поскольку критерии МУК отличаются от обновленных критериев CLSI и EUCAST. Интересно отметить, что 28 (53,8%) штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к этим препаратам, оказались нечувствительными и к цефтазидиму. При анализе данных по ассоциированной устойчивости к аминогликозидам и фторхинолонам установлено, что 30 (57,7%) имипенемо- и/или меропенеморезистентных штаммов были резистентны к амикацину и 44 (84,6%) – к ципрофлоксацину.

Аналогичная ситуация наблюдалась и в других ЛПУ. В частности в ЛКБ 62,5% штаммов были устойчивы к цефтазидиму и амикацину и каждый второй – к ципрофлоксацину. В ОРИТ ОКБ и ИС все изоляты оказались полирезистентными.

Самая благоприятная ситуация выявлена в РД, где только 6 (16,6%) штаммов из 36 были устойчивыми к карбапенемам, из которых только один изолят был резистентным к цефтазидиму при 100% чувствительности к ципрофлоксацину и амикацину. В детском стационаре выявлено 24 (47%) карбапенеморезистентных штамма *P. aeruginosa*, из которых только 3 культуры оказались устойчивыми к амикацину и 2 – к ципрофлоксацину.

Поскольку сочетанная устойчивость к меропенему и имипенему, выявленная нами у каждого третьего изолята, может быть обусловлена продукцией карбапенемаз, дальнейшее исследование было направлено на поиск этих ферментов. У 49 штаммов синегнойной палочки фенотипически (рис. 1) выявлена выработка металло-бета-лактамаз: в ГКБ – у 34, ККБ – у 6, ИС – у 5 и в ЛКБ – у 4 штаммов.

Среди штаммов, обладающих фенотипическими признаками продукции металло-бета-лактамаз

Таблица 3. Анализ аминокислотных последовательностей металло-бета-лактамаз изолятов *Pseudomonas aeruginosa*

Группа металло-бета-лактамаз	Аминокислотная последовательность	Размер, п. н.
VIM2-60 VIM2-3-16 COL-1 VIM2-2PL VIM2-31	-----AIASPLAFSVDSGGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ -----SPLAFSVDPGGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSVDSGGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ -----LVYLTASIMAIASPLAFSVDPGGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ -----AFSVDPGGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM2-60 VIM2-3-16 COL-1 VIM2-2PL VIM2-31	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM2-60 VIM2-3-16 COL-1 VIM2-2PL VIM2-31	GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA	180
VIM2-60 VIM2-3-16 COL-1 VIM2-2PL VIM2-31	TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADLAEWPT----- TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIPGL TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIPGH TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADL----- TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADL-----	240
VIM2-3-16 COL-1	GLPGGLDLLKHTTNVVKANTNRSVVE GLPGGLDLLKHTTNVVKANTNRSVVE	266

класса В, методом ПЦР проведен скрининг на наличие в их геноме нуклеотидных последовательностей, кодирующих ферменты групп VIM и IMP. С матрицы ДНК 34 изолятов из 3 стационаров (ГКБ, ККБ, ЛКБ) были получены ПЦР-продукты (с праймерами для VIM ферментов) размером около 260 п.н. и 800 п.н. (рис. 2). У прочих 15 изолятов возможно наблюдался ложноположительный результат в ЭДТА-тесте, либо их устойчивость связана с продукцией других металло-бета-лактамаз.

У четырех изолятов (3-16, 2PL, 31 и 60) из 2 территориально удаленных стационаров определены нуклеотидные последовательности «коротких» и «длинных» фрагментов генов металло-бета-лактамаз размером 200–237 п.н. и 580–741 п.н. соответственно. С помощью программы BLAST по международным базам данных GenBank/EMBL/DBJ проведен поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных амплифицированным фрагментам ДНК. Исследуемые участки ДНК были на 98–100% сходны с генами металло-бета-лактамаз VIM-2. Наибольшее сходство наблюдалось с геном *bla*_{VIM-2} известного штамма *P. aeruginosa* COL-1 (GenBank AF191564.1). Анализ результатов секвенирующей реакции «короткого» фрагмента показал высокий уровень гомологии с «внутренней частью» гена *bla*_{VIM-2}.

На основании полученных данных установлено на частичная аминокислотная последовательность (193–246 а.о.) VIM бета-лактамаз у исследованных 4 изолятов. Поиск гомологичных белков по международным базам данных выявил высокий уровень идентичности (98–100%) к металло-бета-лактамазам группы VIM-2. Полная гомология аминокислотных последовательностей обнаружена у одного штамма, изолированного из ЛКБ (табл. 3). Различия в аминокислотной последовательности бета-лактамаз из референтного штамма *P. aeruginosa* COL-1 и штаммов 31 и 2PL (ЛКБ) выявлены только в одной позиции S29P, а у штамма 3-16 (ГКБ) обнаружена аминокислотная замена не только серина на пролин, но и гистидина на лейцин (H240L). Результаты сравнительного анализа лактамаз изученных штаммов и известных ферментов группы VIM дают основание отнести их к VIM-2-подобным ферментам.

Таким образом, можно предположить, что устойчивость к карбапенемам 34 культур *P. aeruginosa*, изолированных из разных стационаров Перми, обусловлена присутствием у них металло-бета-лактамаз группы VIM, и в частности – фермента VIM-2. Полученные результаты согласуются с данными литературы о распространенности VIM-2-обусловленной карбапенеморезистентности внутрибольничных штаммов в России и странах Европы [10, 14, 25].

Заключение

Выявлена высокая частота фенотипической устойчивости к меропенему и/или имипенему у штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из разных стационаров Перми. Серьезные опасения вызывает ее уровень в ОРИТ этих лечебных учреждений, хотя еще в 90-х годах прошлого столетия в многоцентровом клиническом исследовании, проведенном в России, 92% изолятов *P. aeruginosa* от больных с тяжелыми инфекциями в ОРИТ были чувствительны к меропенему [28]. По нашим данным, более благоприятная ситуация отмечена в детских и родовспомогательных лечебных учреждениях. Невысокий процент штаммов, устойчивых к карбапенемам, и отсутствие среди них продуцентов металло-бета-лактамаз не исключают возможности использования карбапенемов в этих ЛПУ.

Несмотря на то что только в 16,3% случаев были детектированы фрагменты генов металло-бета-лактамаз группы VIM-2, можно ожидать рост устойчивости к карбапенемам госпитальной синегнойной палочки, так как эти гены часто локализованы в виде интегронных кассет в составе мобильных элементов [16, 24, 29]. Данные локального мониторинга резистентности должны способствовать рационализации использования карбапенемов при лечении нозокомиальных инфекций в конкретном стационаре.

Авторы выражают благодарность Главному бактериологу г. Пермь Н.С. Авдеевой, врачу-бактериологу ГКБ № 7 И.П. Новоселовой, зав. лаб. ГКБ № 4 М.И. Еремеевой, врачу-бактериологу О.Е. Ямлихановой за оказанное содействие в сборе нозокомиальных культур *P. aeruginosa*.

Литература

1. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. Инфекц Антимикроб Тер 2003; 5(1):170-7.
2. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Рус Мед Журн 2005; 13(7):485-90.
3. Shah P.M. Parenteral carbapenems. Clin Microbiol Infect 2008; 14(Suppl 1):175-80.
4. Tsakris A., Pournaras S., Woodford N., et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol 2000; 38:1290-2.
5. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Стецюк О.У. и соавт. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2003; 5(1):35-46.
6. Гудкова Е.И., Адарченко А.А., Слабко И.Н., Ласточкина Т.М., Симоненко Л.И. Микробиологический мониторинг госпитальных эквоаров условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций. Мед Нов 2003; (3):11-5.
7. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Фаращук А.Н., Страчунский Л.С., исследовательская группа РОСНЕТ. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2006; 8(3):243-59.
8. Иванов Д.В., Крапивина И.В. Этиология внутрибольничных хирургических инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, и профиль их антибиотикорезистентности. Журн Микробиол 2007; (5):90-3.
9. Галкин Д.В., Козлов Р.С. Современные возможности терапии тяжелых инфекций: цефоперазон/сульбактам и его роль в преодолении резистентности возбудителей нозокомиальных инфекций. Фарматека 2006; 4(119):18-27.
10. 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.
11. Зубков М.Н. Роль карбапенемов в условиях эскалации антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий. Рус Мед Журн 2008; 16(2):106-16.
12. Иванов Д.В., Бунятян Н.Д., Утешев Д.Б., Корсун Л.В. Особенности антибиотикочувствительности важнейших грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций. Вест Росс Гос Мед Универ 2009; (2):26-9.
13. Галкин Д.В. Карбапенемы через 20 лет после открытия: современные микробиологические и клинические аспекты. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2007 9(2):133-52.
14. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20:440-58.
15. Collis C.M., Hall R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:155-62.
16. Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., et al. A novel integron-like element carrying the metallo-β-lactamase gene *bla*IMP. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1612-5.
17. Lee K., Lim J.B., Yum J.H. et al. [bla.sub.VIM-2] cassette-containing novel integrons in metallo-[beta]-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1053-8.

18. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г.
19. «Определение грамотрицательных потенциально патогенных бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций. Методические рекомендации». МУК МЗ РСФСР от 03.06.1986 г.
20. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» МУК 4.2. 1890-04.
21. Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K. et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38:40-3.
22. Stone G.G., Oberst R.D., Hays S., McVey S., Chengappa M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1742-9.
23. Poirel L., Naas T., Nicholas D., et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:891-7.
24. Shibata N., Yohei D., Kunikazu Y., et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5407-13.
25. Черкашин Е.А., Федорчук В.В., Иванов Д.В., Сидоренко С.В., Тишков В.И. Исследование распространенности метало-бета-лактамаз в Российской Федерации. *Вестн Моск Унив (Химия)* 2006; 47(3):83-6.
26. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment. *Nucl Acids Res* 1994; 22:4673-80.
27. Van de Peer Y., DeWachter R. TREECON for Windows a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* 1994; 10:569-70.
28. Яковлев С.В., Яковлев В.П., Деревянко И.И., Кира Е.Ф. и группа изучения меропенема. Многоцентровое открытое рандомизированное исследование меропенема в сравнении с комбинацией цефтазидима и амикацина при тяжелых госпитальных инфекциях. *Антиб Химиотер* 1998; 43(1):15-23.
29. Lauretti L., Riccio M.L., Mazzariol A., et al. Cloning and characterization of [bla.sub.VIM], a new integron-borne metallo-[beta]-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1584-90.