

Слизень В. В.

**СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ
КАРБАПЕНЕМАЗ СРЕДИ МИКРООРГАНИЗМОВ.
ДЕТЕКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА
РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ
BACTEROIDES SPP. – *cfiA* ГЕНА**

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Карбапенемы являются высоко активными препаратами против большинства микроорганизмов, в том числе и анаэробов, что обусловлено стабильностью этой группы антибиотиков к большинству бактериальных β -лактамаз [19]. Расширенное использование карбапенемов, оказывающее селективное давление, приводит к росту частоты встречаемости устойчивых к имипенему анаэробов в некоторых регионах с 0,5–0,8 % до 2,0–5,9 % для *Bacteroides fragilis* и до 2,5–6,1 % для *B. thetaiotaomicron* [1–3, 7, 10]. Существующие тенденции к подъему уровней резистентности к карбапенемам требуют проведения мониторинга устойчивости микроорганизмов к ним, а также диктуют необходимость изучения генетических детерминант и механизмов экспрессии карбапенемаз, что в перспективе позволит ограничить горизонтальный внутривидовой и межвидовой перенос генов устойчивости.

Карбапенемазы — группа гидролитических ферментов, разрушающая все группы β -лактамных антибиотиков, в том числе карбапенемы, устойчивая к ингибиторам β -лактамаз. Выделяют две группы карбапенемаз, отличающихся структурой активных центров и механизмом гидролиза β -лактамных антибиотиков: сериновые и метало- β -лактамазы. Впервые метало- β -лактамазы, содержащие ионы Zn^{2+} в активном центре и потому ингибируемые ЭДТА, выявили у грамположительных микроорганизмов. В середине 1980-х гг. у представителей семейства *Enterobacteriaceae* были описаны карбапенемазы с серином в активном центре, не ингибируемые ЭДТА, но подавляемые ингибиторами β -лактамаз — клавулановой кислотой и тазобактамом. До начала 1990-х гг. благодаря расположению генетических детерминант в хромосоме, карбапенемазы не имели тенденции к межвидовой передаче и потому проявляли видовую специфичность, микроорганизмы же, их содержащие, вызывали спорадические заболевания. Но позже все чаще стали появляться сообщения о кодируемых плазмидами карбапенемазах у *Pseudomonas aeruginosa* (IMP-1), *Acinetobacter baumannii* (ARI-1/OXA-23), *Klebsiella pneumoniae* (KPC-1), что свидетельствовало о межвидовом распространении детерминант резистентности, представляющем глобальную проблему. В настоящее время большинство карбапенемаз (98 %) выявляется среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*,

что связано с существованием у них высокоэффективных механизмов горизонтальной передачи генов [13, 17, 19, 23, 24].

Устойчивость к карбапенемам у *B. fragilis* связана с продукцией металло-β-лактамазы с двумя ионами Zn^{2+} в активном центре, кодируемой геном *cfiA*. Нередко *cfiA*-ген находится в молчащем состоянии. Увеличению частоты выделения резистентных вариантов *Bacteroides spp.* к имипенему предшествует рост носительства *cfiA* гена, что связано со способностью *cfiA* позитивных штаммов конвертировать в резистентные за счет инсерции впереди гена промотора в составе IS последовательностей — IS1186, IS942, IS4351, что обуславливает важность проведения не только фенотипического определения чувствительности культур к имипенему, но и выявление *cfiA* гена с использованием методов молекулярно-генетического анализа [5, 6, 22].

Цель работы: разработать метод выявления гена резистентности к карбапенемам *cfiA* и выявить частоту его встречаемости и экспрессии у клинических изолятов бактероидов, а также изучить состояние проблемы распространенности и типов генетических детерминант резистентности к карбапенемам среди различных групп микроорганизмов.

Материалы и методы

Исследовано 40 культур *Bacteroides spp.* (выделены от больных с парапроктитом и осложненным аппендицитом) на присутствие *cfiA* гена, контролирующего резистентность к карбапенемам. Фенотипическую резистентность к имипенему проверяли диско-диффузионным методом (диск с имипенемом 10 мкг) на кровяном анаэробном агаре.

Скрининг *cfiA* гена осуществляли путем амплификации ДНК с использованием *cfiA* специфических праймеров. С целью идентификации образуемых фрагментов проводили их секвенирование и биоанализ.

Экстракция бактериальной ДНК. Экстракцию бактериальной ДНК проводили с использованием 5 % раствора Chelex-100 в 1хТАЕ буфере: в 100 мкл 5 % Chelex-100 в 1хТАЕ буфере вносили полную бактериальную петлю 16–20-часовой чистой культуры *Bacteroides spp.*; кипятили на водяной бане в течение 10 мин, клеточный дебрис осаждали ультрацентрифугированием (15 000 об./мин — 10 мин), 40 мкл супернатанта переносили в чистые микроцентрифужные пробирки.

ПЦР. Исследуемую экстрагированную ДНК в количестве 10 мкл вносили в 40 мкл ПЦР смеси, содержащей из расчета на одну реакцию: 10хПЦР буфера — 5 мкл, $MgCl_2$ (25 мМ) — 3 мкл, раствор нуклеотидов (2 мМ) — 5 мкл, Taq полимеразу — 1,25 Ед, праймеры прямые и обратные — по 20 пкмоль каждого, деионизованную воду — до 40 мкл. Используемые для амплификации *cfiA* гена прямой и обратный праймеры имели следующие последовательности: прямой — 5' TCC ATG CTT TTC CCT

GTC GCA GTT AT 3' и обратный — 5' AT AAC TGC GAC AGG GAA AAG CAT GGA 3'.

cfiA ген амплифицировали соблюдая следующий температурный режим: 95 °С — 3 мин, 30 циклов (95 °С — 45 с, 52 °С — 60 с, 72 °С — 90 с), далее 72 °С — 10 мин, 4 °С — *add infinitum*.

Наличие специфических продуктов амплификации (750 п.о.) выявляли электрофорезом (200 В, 100 мА, 1 час) 12 мкл образцов в 2 % агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) в 1xTAE буфере.

Секвенирование *cfiA* гена. Для подтверждения специфичности образующих фрагментов проводили определение их нуклеотидной последовательности. Полученную ПЦР-ДНК подвергали очистке с помощью колонок «QIAquick-spin PCR clean up columns» (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, UK). Секвенирование проводили при помощи набора «ABI-PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing reaction kit» (Perkin-Elmer, Warrington, UK). Готовили реакционную смесь: 2 мкл *cfiA* праймера (в концентрации 1,6 пкмоль/мкл), BigDye terminator (4 мкл), 4–10 мкл ПЦР-продуктов. Объем пробы доводили деионизованной безнуклеазной водой до 20 мкл, после чего ультрацентрифугировали и наслаивали 40 мкл вазелинового масла. Секвенирование проводили в термоциклере запрограммированном на следующий режим: 30 циклов (быстрый подъем температуры до 96 °С, 96 °С — 30 с, быстрое падение до температуры 48 °С, 48 °С — 15 с, быстрый подъем до 60 °С, 60 °С — 4 мин). После чего образцы охлаждались до 4 °С. Для удаления минерального масла и неинкорпорированных меток образцы центрифугировали и аккуратно извлекали 19,5 мкл из-под минерального масла, после чего смешивали с 2 мкл 3 М ацетата натрия и 50 мкл этанола (99,7 %), центрифугировали и выдерживали при комнатной температуре 15 мин. После чего смесь повторно центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 20 мин. Удаляли супернатант, вносили 200 мкл 70 % этанола, центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об./мин, удаляли 200 мкл 70 % этанола. Далее проводился электрофорез в полиакриламидном геле в ABI 377 автосеквенаторе. Результаты секвенирования — одноцепочечную последовательность нуклеотидов — проверяли на наличие ошибок расшифровки (неправильно идентифицированы нуклеотиды) и достраивали дуплекс программой DNASIS (HITACHI SOFTWARE, Yokohama, Japan). Идентификацию генома проводили с использованием программы BLAST.

Результаты и обсуждение

Исследованные культуры *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* не проявляли резистентности к имипенему в диско-диффузионном методе, о чем свидетельствовали зоны задержки роста вокруг дисков более 18 мм. Носительство *cfiA* гена, которое не влияет на уровни резистентности культур, невозможно выявить фенотипическими методами, поэтому нами про-

веден скрининг *cfiA* гена ПЦР методом с использованием специфических праймеров. Метод позволяет идентифицировать *cfiA* ген, о чем свидетельствует образование специфических фрагментов амплификации размером 750 п.о. (рис. 1).

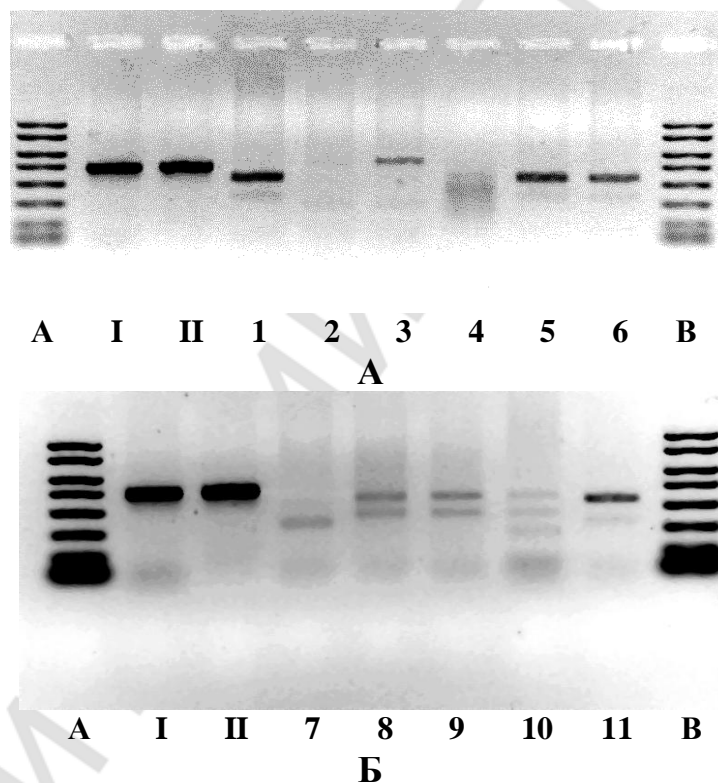


Рис. 1. Результаты амплификации ДНК *Bacteroides spp.* с целью выявления *cfiA* гена: треки А, В — стандарт молекулярного веса, 2 т.п.о.; треки I, II — положительные контроли по *cfiA* гену; треки 1–11 — исследуемые культуры

На приведенных на рис. 1 электрофореграммах видно, что штаммы *B. fragilis* с *cfiA* геном образует ПЦР-продукты размером 750 п.о. При амплификации некоторых культур *B. fragilis* (треки 1, 5, 6, 7, 11) и *B. thetaiotaomicron* (треки 8, 9) образовывались фрагменты, но в отличие от контроля I, II (с ПЦР продуктами — 750 п.о.) они имели несколько меньший размер (между 500–750 п.о.). При амплификации культур *B. fragilis* (трек 3) образовывались фрагменты большего размера (между 1000–750 п.о.). Остальные культуры *B. fragilis* (треки 2, 4), *B. thetaiotaomicron* (трек 10) были отрицательны по *cfiA* гену (продукты амплификации отсутствовали). Таким образом, при проведении ПЦР часть исследованных культур образовывала продукты амплификации, но в отличие от контроля (размер 750 п.о.) фрагменты имели больший (между 750–1000 п.о.) либо меньший (500–750 п.о.) размер.

Секвенирование фрагментов ДНК бактероидов, отличающихся размером от продуктов амплификации в контроле. С целью определения специфического/неспецифического характера образуемых при ампли-

фикации ДНК-фрагментов было проведено секвенирование 3 типов фрагментов (рис. 2).

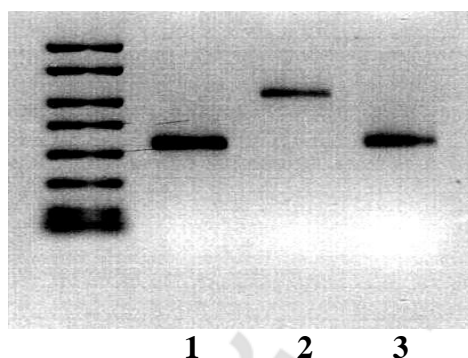


Рис. 2. Секвенированные фрагменты ДНК *Bacteroides spp.*:
1 — контроль с размером 750 п.о., 2, 3 — секвенированные фрагменты

Результаты секвенирования корректировали на присутствие ошибок интерпретации в полученных последовательностях нуклеотидов. Полученные последовательности нуклеотидов идентифицировали и оценивали с помощью базы данных программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Программа позволяет идентифицировать геном или его фрагмент путем сравнения с виртуальным банком данных последовательностей нуклеотидов ДНК или аминокислот белков (доступ через сервер <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Исследуемые последовательности в 480 и 357 п.о. не были идентифицированы программой как *cfiA* ген или плазмиды, несущие этот ген.

Таким образом, исследованные культуры *Bacteroides spp.* были отрицательны по *cfiA* гену, что коррелировало с фенотипической чувствительностью к имипенему (табл. 1).

Таблица 1

Резистентность к имипенему *Bacteroides spp.*

Штаммы	Резистентность/чувствительность к имипенему, R/S	Присутствие <i>cfiA</i> гена
Контрольные штаммы		
<i>B. fragilis</i> (ARU 14 750)	R	<i>cfiA</i>
<i>B. fragilis</i> (ARU 15 029)	R	<i>cfiA</i>
Исследуемые штаммы, n = 40		
<i>B. fragilis</i> (n = 14)	S	—
<i>B. thetaiotaomicron</i> (n = 21)	S	—
<i>B. ovatus</i> (n = 5)	S	—

Таким образом, несмотря на увеличение в различных регионах (Великобритания, Франция, Япония, Германия) частоты выделения устойчивых к имипенему форм *Bacteroides spp.* [1, 2, 5–7, 10, 22], в Республике Беларусь этот препарат сохраняет свою высокую эффективность: все исследованные нами культуры *Bacteroides spp.* проявляли чувствительность к имипенему.

Кроме *Bacteroides spp.* резистентность к имипенему выявлена у *Bacillus cereus*, *Legionella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, *Klebsiella pneumoniae* [5, 6, 22]. Отмечающийся рост резистентности к имипенему связан с горизонтальной межвидовой и внутривидовой передачей генетических детерминант устойчивости и селекцией вследствие применения карбапенемов резистентных форм.

Исследования β -лактамаз до появления молекулярно-генетических методов основывались на выделении белка и изучении его биохимических характеристик: изоэлектрической точки, спектра гидролизуемых субстратов и ингибиторов фермента, в результате чего появилась функциональная классификация β -лактамаз, разделяющая их на 4 функциональные группы (1–4) с подгруппами в группе 2. Согласно этой предложенной Бушем в 1988 г. классификации [4, 8, 9, 16], карбапенемазы входили в состав групп 2f и 3, при этом метало- β -лактамазы из группы 3 в зависимости от субстратной специфичности подразделялись на 3 подгруппы.

Согласно предложенной Frere и др. молекулярной классификации [4, 8, 9, 16], основанной на сходстве аминокислотного состава, β -лактамазы подразделяются на 4 группы (A, B, C, D), при этом карбапенемазы входят в состав групп A, B, D, из которых A и D включают сериновые β -лактамазы, группа B (состоит из 3 подклассов B1–3) включает металоферменты с Zn^{2+} в активном центре. Для функционирования ферментов B1 и B3 подклассов необходимы два иона Zn^{2+} в активном центре, для B2 подкласса — один, при этом второй ион Zn^{2+} ингибирует представителей B2 подкласса.

КЛАСС А. Сериновые карбапенемазы NMC/IMI, SME, KPC и GES (соответствуют функциональной группе 2f). Впервые описаны 20 лет назад у *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella spp.* В активном центре обязательно присутствует серин. Карбапенемазы SME, NMC, IMI кодируются хромосомой, KPC, IMI-2, GES — плазмидой. Как и все представители класса А, эти карбапенемазы содержат 3 консервативные последовательности в активном центре S-X-X-K, S-D-N и K-T-G, а также 2 молекулы цистеина в положениях 69 и 238, формирующие дисульфидный мостик, стабилизирующий структуру активного центра фермента. Впереди генов NMC-A, IMI-1 и SME-1 располагаются гены-регуляторы транскрипции (из семейства LysR) [23, 33], индуцируемые имипенемом и цефокситином. Мутации в генах-регуляторах приводят к подавлению резистенсгенов и восстановлению чувствительности к карбапенемам. Бактерии с карбапенемазами класса А имеют сниженную чувствительность к карбапенемам либо устойчивы к ним. Субстратный профиль этих карбапенемаз включает карбапенемы, цефалоспорины, пенициллины и монобактамы, ингибируются клавулановой кислотой и тазабактамом [13, 17, 19, 23, 24].

Кодируемые хромосомой карбапенемазы класса А: NMC/IMI, SME.

SME. Карбапенемаза SME-1 впервые описана у *Serratia marcescens*, выделенной в Англии в 1982 г. SME-1 и схожие с ней SME-2, SME-3 спорадически выявляют в США [13, 17, 19, 23, 24].

NMC/IMI. IMI и NMC-A выделены у больничных штаммов *E. cloacae* в США, Франции, Аргентине. Гены этих β-лактамаз локализованы в бактериальной хромосоме и не связаны с мобильными генетическими элементами, что и обуславливает их незначительную распространенность, однако у *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae*, выделенных в США и Китае, ген карбапенемазы IMI-2 находится в составе плазмиды. По аминокислотному составу оба фермента NMC-A и IMI-1 сходны на 97 % и проявляют подобие состава со SME-1 на 70 % [20].

Карбапенемаза NMC-A, в отличие β-лактамаз TEM-1, также относящихся к классу А, но не проявляющих карбапенемазную активность, имеет большую связывающую субстрат полость в активном центре и несколько измененную его конформацию, что увеличивает доступ субстрата к активному центру. SME-1 отличается от TEM и NMC-A уменьшенным размером углубления активного центра (между Ser70 и Glu166), что не оставляет места для молекул воды и делает активный центр более гидрофобным [13, 20].

Кодируемые плазмидами карбапенемазы класса А — KPC и GES.

KPC. Эта впервые описанная в 1996 г. в США у *Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза кодируется конъюгативной плазмидой и может выявляться также у *Enterobacter spp.* и *Salmonella spp.* KPC позитивные *K. pneumoniae* представляют глобальную проблему, так как встречаются в США, Франции, Шотландии, Колумбии, Израиле, Китае и способны к быстрому распространению. Субстратный профиль KPC — все β-лактамы антибиотики, за исключением ингибиторозащищенных β-лактамов (нитроцефин, цефалотин, цефалоридин, бензилпенициллин, ампициллин, пиперациллин, имипенем, меропенем, цефотаксим, азтреонам). Слабый гидролиз KPC проявляют в отношении цефокситина и цефтазидима. В настоящий момент описаны три варианта — KPC-1, KPC-2, KPC-3. Фермент KPC-2 был идентифицирован в составе плазмид *P. aeruginosa* в 2003 г. и произошел из KPC-1 в результате точечной мутации. Штаммы с KPC-2 обычно имеют повышенные МИК, но не устойчивы к карбапенемам. KPC-3 идентифицированы у *Enterobacter spp.* KPC проявляют 45 % сходства со SME карбапенемазами и имеют типичную для класса А структуру активного центра [3, 11, 14].

GES/IBC. Представители IBC семейства впервые описаны в 2000 г. у *E. cloacae* в Греции. GES-1 (гвианские β-лактамазы расширенного спектра) выявлены у *K. pneumoniae*, GES-2 — у *P. aeruginosa* во Франции и Гвиане. Гены GES/IBC β-лактамаз входят в состав интегронов, располагающихся в составе плазмид. Эти ферменты проявляют 36 % подобия

с КРС-2, 35 % — со SME-1, 31 % — NMC-A. В GES/IBC семействе описано 9 ферментов. GES-2, GES-4, GES-5 и GES-6 ферменты имеют замену серина на аспарагин в положении 170. GES-9 недавно описана у *P. aeruginosa* во Франции. GES-продуцирующие бактерии выявлены во многих странах (Греции, Франции, Португалии, ЮАР, Гвиане, Бразилии, Аргентине, Корею, Японии), но эпидемическое распространение для них не характерно и вызывают они единичные случаи заболеваний [13, 17, 19, 23, 24].

КЛАСС В. Метало-β-лактамазы. Метало-β-лактамазы способны гидролизовать карбапенемы, но не способны разрушать азтреонам, они устойчивы к существующим ингибиторам β-лактамаз, нуждаются в присутствии ионов Zn^{2+} , чувствительны к ингибирующему воздействию хелатных соединений (ЭДТА). Не все метало-β-лактамазы гидролизуют нитроцефин — широко применяемый колориметрический индикатор β-лактамаз. В активном центре их есть два консервативных участка, связывающие Zn^{2+} , необходимый для их активности. Впервые хромосомные метало-β-лактамазы описаны у *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Карбапенемазы, кодируемые плазмидами, были описаны впервые в Японии у *P. aeruginosa* в 1990 г., после чего у *B. fragilis*. Впервые нуклеотидная последовательность метало-β-лактамазы (BCII) определена у *Bacillus cereus*, далее CcrA (CfiA) — у *Bacteroides fragilis*. Гены многих метало-β-лактамаз вследствие хромосомного расположения подвержены медленному горизонтальному распространению. Гены же карбапенемаз VIM, IMP, GIM и SIM способны к быстрому распространению, так как локализуются в составе интегронов, входящих в транспозоны или плазмиды [13, 17, 19, 23, 24].

IMP. IMP-1 локализуется на плазмидах *P. aeruginosa* или в интегронах у *S. marcescens* и других *Enterobacteriaceae*. Субстратный профиль фермента — все β-лактамные препараты, за исключением азтреонама. Фермент ингибируется ЭДТА и восстанавливает свойства при добавлении Zn^{2+} . В настоящее время описано 18 представителей этого семейства, определены их нуклеотидные последовательности. IMP-2 выявлены у *A. baumannii* в Италии и кодируются геном в составе интегрона класса 1. IMP, продуцирующие штаммы получили умбиквитарное распространение и с высокой частотой встречаются в США и Австралии [4, 8, 9, 16].

VIM. VIM-1 впервые описаны в Вероне в 1997 г, VIM-2 — во Франции в 1996 г. у клинических изолятов *P. aeruginosa*. В настоящий момент эта группа, встречающаяся преимущественно среди *P. aeruginosa*, насчитывает 14 представителей, из которых наиболее распространенным является VIM-2. Гены, кодирующие VIM карбапенемазы, входят в состав интегронов класса 1 [19].

SPM. Новое семейство метало-β-лактамаз, проявляющее 35,5 % идентичности с IMP-1 и SPM-1, впервые описано у штаммов *P. aeruginosa*

в Сан-Паоло, Бразилия, которые вызывали многоцентровые госпитальные вспышки с высокой летальностью. SPM-1 ген входит в состав нового типа мобильных элементов с рекомбиназной и промоторной активностью [19].

GIM-1. Описаны только в Германии у *P. aeruginosa* в 2002 г. и проявляют 30 % гомологии с VIM, 43 % гомологии — с IMP, 29 % — с SPM. GIM-1 входят в состав интегронов класса 1 в составе плазмид [9, 16].

SIM. Описаны в Корее у *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.* (17 % изолятов продуцируют эти метало-β-лактамазы) и проявляет 64–69 % сходства с IMP. Локализуются в составе интегронов класса 1 [23, 24].

Продуцирующие SPM, GIM и SIM метало-β-лактамазы штаммы встречаются только в определенных странах, не выходя за их пределы, в то время как VIM и IMP широко распространены в мире [19].

КЛАСС D. Сериновые OXA-β-лактамазы (β-лактамазы, гидролизующие оксациллин). Это наиболее распространенное среди энтеробактерий и *P. aeruginosa* в 1970–1980-х гг. семейство β-лактамаз, детерминируемых плазмидными генами, расщепляющих оксациллин, клоксациллин и слабо ингибируемых клавулановой кислотой и ЭДТА. Карбапенемазной активностью обладают не все представители этого семейства: в настоящий момент описано 9 β-лактамаз расширенного спектра и 37 карбапенемаз. Субстратами являются пенициллины, некоторые цефалоспорины (исключая цефалоспорины расширенного спектра), имипенем. Карбапенемазы OXA-класса проявляют структурную идентичность в пределах 40–70 %. В активном центре этих ферментов располагается консервативный аминокислотный мотив S-T-F-K с серином в положении 70–73, а также мотив Y-G-N в положении 144–146 и K-T-G в положении 216–218. Некоторые OXA-карбапенемазы имеют замену Y-G-N на F-G-N, но это не влияет на их каталитическую активность. Присутствие в активном центре Tyr-112 и Met-223, характерное только для OXA-карбапенемаз, делает активный центр более компактным и гидрофобным, что способствует лучшим взаимодействиям фермента с карбапенемами. Взаимодействие расщепляемого субстрата с серином активного центра фермента приводит к образованию ковалентно связанного ацилированного интермедиата, который деацитилируется с разрывом C-N связи β-лактамного кольца. CO₂ может влиять на гидролиз субстрата OXA-карбапенемазой, так как карбоксилирует лизин в положении 70 (или 73), образуемый карбамат активирует боковую цепочку в серине активного центра, что потенцирует образование ацилированного интермедиата [25].

Первой описанной в 1993 г. β-лактамазой расширенного спектра была OXA-11, к группе которой относятся OXA-15, OXA-18 и OXA-45. Эти ферменты способны расщеплять цефтазидим, пенициллин, но не имипенем. Первая OXA-β-лактамаза с карбапенемазной активностью, не ингибируемая клавулановой кислотой и ЭДТА, была выявлена Paton et al. в 1993 г.

среди мультирезистентных *A. baumannii*, выделенных в Эдинбурге, Шотландия. Фермент получил название ARI-1 и в дальнейшем был переименован в OXA-23. Гены OXA-23/ARI-1 располагаются в составе плазмиды. OXA-23, продуцирующие *A. baumannii*, были описаны в Бразилии, Великобритании, Корее, Таити. Среди *A. baumannii* выявлены штаммы, продуцирующие карбапенемазы, отличающиеся 2 аминокислотами -OXA-24 и OXA-40 (распространены в США, Испании, Португалии), OXA-58 (встречаются в Ираке, Афганистане) [13,19, 24].

К сериновым карбапенемазам класса D относится группа OXA-51 с входящими в нее ферментами OXA-51, OXA-64–71, OXA-75–78, OXA-83, OXA-84, OXA-86–89, OXA-91, OXA-92, OXA-94, OXA-95.

К классу D относятся также карбапенемазы: 1) OXA-58, найденная у *Acinetobacter spp.* во Франции, Греции, Италии, Румынии, Турции, Аргентине, Кувейте; 2) OXA-55, OXA-48, OXA-54, OXA-SHE, выделенные у *Shewanella algae*; 3) OXA-48, выявленная у *K. pneumoniae* в Турции и обладающая самой выраженной карбапенемазной активностью. OXA-50 группа описана у большинства устойчивых к карбапенемам *P. aeruginosa*, но для генетических детерминант, кодирующих эту группу, характерно носительство без экспрессии. OXA-60 группа описана у *Ralstonia pickettii*, а группа OXA-62 — у *Pandoraea pnomenus* [19].

Таким образом, разработанный метод ПЦР позволяет проводить детекцию молекулярно-генетического маркера резистентности бактериоидов к карбапенемам *cfiA* гена, что позволит осуществлять скрининг носительства этой генетической детерминанты. Проведенный нами с использованием ПЦР скрининг *cfiA* гена свидетельствует об отсутствии носительства *cfiA* гена у исследованных культур. Отсутствие или крайне низкие уровни резистентности к имипенему в одних регионах и повышенные уровни резистентности к имипенему в других регионах свидетельствуют о недавнем приобретении *cfiA* гена *Bacteroides spp.*

Появление резистентных к имипенему *Bacteroides spp.* и микроорганизмов других таксономических групп с разнообразными видами карбапенемаз свидетельствует об активной эволюции механизмов резистентности к β -лактамным антибиотикам, индуцированной широким и длительным применением препаратов этой группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Качерс, М. Экологические аспекты чувствительности к антибиотикам анаэробных бактерий / М. Качерс, К. Э. Норд, А. Веинтрауб // Клин. микроб. антимикроб. химиотерап. 2001. Т. 3, № 1. С. 39–46.
2. Bayley, D. P. Analysis of *cep A* and other *Bacteroides fragilis* genes reveals a unique promoter structure / D. P. Bayley, E. R. Rocha, C. J. Smith // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 193. P. 149–154.
3. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York / S. Bratu [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. № 49. P. 776–778.

4. *Bush, K.* A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure / K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. № 39. P. 1211–1233.
5. *Prevalence* and degree of expression of carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* in Nottingham, UK / R. Edwards [et al.] // *J. Antimicrob. Chemoth.* 1999. Vol. 43 P. 273–276.
6. *Edwards, R.* Expression of the carbapenemase gen (*cfiA*) in *Bacteroides fragilis* / R. Edwards, P. N. Read // *J. Antimicrob. Chemoth.* 2000. № 46. P. 1009–1012.
7. *New finding* in beta-lactam and metronidazole resistance *Bacteroides fragilis* group / H. Fang [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2002. Vol. 19, № 5. P. 361–370.
8. *Is it necessary* to change the classification of β -lactamases? / J. M. Frere [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. № 55. P. 1051–1053.
9. *Update* of the standard numbering scheme for class B β -lactamases/ G. Garau [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. № 48. P. 2347–2349.
10. *Comparative study* of the *Bacteroides fragilis* group species and other anaerobic bacteria to meropenem, imipenem, piperacillin, cefoxitin, ampicillin/sulbactam, clindamycin and metronidazole / E. J. C. Goldstein [et al.] // *J. Antimicrob. Chemoth.* 1993. № 31. P. 363–372.
11. *Hossain, A.* Plasmidmediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. / A. Hossain, M. J. Ferraro, R. M. Pino // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. № 48. P. 4438–4440.
12. *Huovinen P.* Sequence of PSE-2 β -lactamase / P. Huovinen, S. Huovinen, G. A. Jacoby // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988. № 32. P. 134–136.
13. *Livermore, D. M.* The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* / D. M. Livermore, N. Woodford // *Trends Microbiol.* 2006. № 14. P. 413–420.
14. *Imipenem* resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 / V. Miriagou [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. № 47. P. 1297–1300.
15. *Murphy, T. A.* Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo- β -lactamases / T. A. Murphy [et al.] // *J. Mol. Biol.* 2006. № 357. P. 890–903.
16. *Naas, T.* Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein / T. Naas, P. Nordmann // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. № 91. P. 7693–7697.
17. *Nordmann, P.* Emerging carbapenemases in Gramnegative aerobes / P. Nordmann, L. Poirel // *Clin. Microbiol. Infect.* 2002. № 8. P. 321–331.
18. *Molecular analysis* of metallo- β -lactamase gene *blaSPM-1*-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil / L. Poirel [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. Vol. 48. P. 1406–1409.
19. *Queenan, A. M.* Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases / A. M. Queenan, K. Bush // *Clin. Microbiol. Rev.* 2007. Vol. 20, N 3. P. 440–458.
20. *Characterization* of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae* / B. A. Rasmussen [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. N 40. P. 2080–2086.
21. *Rasmussen B. A.* Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases / B. A. Rasmussen, K. Bush // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. N 41. P. 223–232.
22. *Prevalence* of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical and normal flora isolates of *Bacteroides* species in Hungary / J. Soki [et al.] // *J. Med. Microbiol.* 2000. Vol. 49, N 5. P. 427–430.

23. Walsh, T. R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria / T. R. Walsh // Clin. Microbiol. Infect. 2005. N 11. P. 2–9.
24. Metallo- β -lactamases : the quiet before the storm? / T. R. Walsh [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. 2005. N 18. P. 306–325.
25. Walther-Rasmussen, J. OXA-type carbapenemases / J. Walther-Rasmussen, N. Hoiby // J. Antimicrob. Chemother. 2006. N 57. P. 373–383.

Slizen V. V.

State of the problem of carbapenemases prevalence among microorganisms. Detection of a carbapenems resistance genetic marker of *Bacteroides spp.* – *cfiA* gene

Current tendency in upsurge of the resistance to carbapenems requires study of genetic determinants and mechanisms of carbapenemases expression. Resistance of *Bacteroides spp.* to carbapenems is associated with the production of metallo- β -lactamase with two ions Zn^{2+} in the active site, encoded by *cfiA* gene that can be down regulated and thus silent. The objective of the study was to determine *cfiA* gene prevalence among *Bacteroides spp.* Forty isolates of *Bacteroides spp.* were screened for the presence of *cfiA* gene by PCR. Studied isolates of *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* showed neither phenotypic resistance to imipenem in the disk diffusion method nor *cfiA* gene presence. Thus, investigated isolates of *Bacteroides spp.* did not harbor silent *cfiA* gene.