

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Савинова Т. А.¹, Бочарова Ю. А.¹, Лазарева А. В.¹, Чеботарь И. В.², Маянский Н. А.³

РАЗНООБРАЗИЕ ИНТЕГРОНОВ У *BLA_{VIM-2}*-НЕСУЩИХ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава РФ», 119296, Москва, Россия;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», 111123, Москва, Россия;

³Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 119571, Москва, Россия

Рост распространённости продуцента металло-β-лактамаз (МБЛ) Pseudomonas aeruginosa в популяциях внутрибольничных патогенов связан с клональным распространением и/или горизонтальным переносом МБЛ в составе мобильных генетических элементов, в том числе интегронов.

Цель: охарактеризовать генетическое окружение гена, кодирующего бета-лактамазу VIM-2, в популяции карбапенем-резистентных (Карба-Р) клинических изолятов P. aeruginosa. Детекцию интегронов класса 1 проводили методом ПЦР. Типирование интегронов, несущих bla_{VIM-2}-генную кассету, осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism) с последующим секвенированием переменных регионов интегрона. В популяции P. aeruginosa выявлено пять типов bla_{VIM-2}-несущих интегронов: ST654-изоляты, составлявшие более 50% Карба-Р популяции, являлись носителями In56; ST235-изоляты содержали In559 (26% Карба-Р изолятов); ST111-изоляты (19% Карба-Р изолятов) характеризовались In59-подобной структурой интегрона; по одному ST235-изоляту являлись носителями In59 и In249. За исключением In56, несущего единственную генную кассету bla_{VIM-2}, выявленные типы интегронов характеризовались наличием дополнительных генов резистентности к триметоприму и/или аминогликозидам. В исследованной популяции P. aeruginosa не выявлено новых типов интегронов. Наблюдаемая корреляция типа интегрона с определёнными ST может свидетельствовать о преимущественной диссеминации клинически значимых детерминант резистентности, связанной с клональным распространением эпидемических линий ST111, ST654 и ST235. Особенности переменных участков интегронов могут быть использованы для эпидемиологической характеристики клинических изолятов P. aeruginosa.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; карбапенемрезистентность; металло-β-лактамазы; VIM-2; интегроны.

Для цитирования: Савинова Т. А., Бочарова Ю. А., Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Маянский Н. А. Разнообразие интегронов у *bla_{VIM-2}*-несущих карбапенемрезистентных клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (8): 497-502. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-8-497-502>

Savinova T.A.¹, Bocharova Yu.A.¹, Lazareva A.V.¹, Chebotar I.V.², Mayanskiy N.A.³

INTEGRON DIVERSITY IN *BLA_{VIM-2}*-CARRYING CARBAPENEM-RESISTANT CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

¹National Medical Research Center for Children's Health Federal state autonomous institution of the Russian Federation Ministry of Health, Russia, 119296, Moscow, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 111123, Moscow, Russia;

³Russian Children's Clinical Hospital, Pirogov Russian National Research Medical University of the Russian Federation Ministry of Health, 119571, Moscow, Russia

The growing prevalence of metallo-β-lactamase (MBL)-producing Pseudomonas aeruginosa in nosocomial pathogen populations has been attributed to their clonal spread, and/or horizontal transfer of MBL determinants in mobile genetic elements, including integrons. To characterize the genetic background of the beta-lactamase VIM-2 encoding gene in the population of carbapenem-resistant (Carba-R) P. aeruginosa clinical isolates. The detection of class 1 integrons was performed by PCR. Typing of the class 1 integrons containing the bla_{VIM-2} gene cassette was performed by the PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) approach followed by sequencing of variable regions of class 1 integrons. Five types of the bla_{VIM-2}-carrying integrons were identified: ST654-isolates accounting for more than 50% of the Carba-R population harbored In56; ST235-isolates contained In559 (26% Carba-R isolates); ST111-isolates (19% Carba-R isolates) were characterized by carrying In59-like integron; two ST235-isolates harbored In59 and In249 each. Except In56, carrying the only bla_{VIM-2}-gene cassette, all other identified integron types harbored the genes of resistance to trimethoprim and/or aminoglycosides. No new types of integrons were identified in the P. aeruginosa clinical isolates. The observed correlation of the integron type with specific STs indicates a clonal dissemination of significant resistance determinant producers - ST111, ST654 and ST235 epidemic lines. The features of the integron variable regions can be used for the epidemiological characterization of clinical P. aeruginosa isolates.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; resistance to carbapenems; metallo-β-lactamase; VIM-2; integrons.

For citation: Savinova T. A., Bocharova Yu. A., Lazareva A. V., Chebotar I. V., Mayanskiy N. A. Integron diversity in *bla_{VIM-2}*-carrying carbapenem-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (8): 497-502 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-8-497-502>.

For correspondence: Savinova T.A., Ph.D., Senior Research Fellow, Molecular microbiology Laboratory; e-mail: taniasavinova@gmail.com

Для корреспонденции: Савинова Татьяна Александровна, канд. биол. наук, ст.науч. сотр. лаб. мол.микробиологии; e-mail: taniasavinova@gmail.com

Information about authors:

Savinova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-5484-5098>
Bocharova Yu.A., <http://orcid.org/0000-0003-0197-0255>
Lazareva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7149-5387>
Chebotar I.V., <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>
Mayanskiy N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-5313>

Acknowledgment. The study was funded by Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-015-00301).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Received 16.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. *Pseudomonas aeruginosa*, один из наиболее значимых оппортунистических патогенов, обладает природной резистентностью к широкому спектру анти-микробных препаратов [1, 2]. Многие штаммы этого возбудителя могут быстро приобретать резистентность к таким стандартным противосинегнойным антибиотикам, как карбапенемы и аминогликозиды, нередко сохраняя чувствительность только к колистину [3-5].

Хотя резистентность к карбапенемам у *P. aeruginosa* в основном связана с мутациями, приводящими к потере или инактивации порина OprD, или гиперэкспрессией эффлюксных систем [6], высокие уровни резистентности обычно бывают опосредованы продукцией карбапенемазы, в первую очередь металло-β-лактамаз (МБЛ) [7]. Инфекции, вызванные МБЛ-продуцирующими изолятами *P. aeruginosa*, связаны с более высокой смертностью и с более высокой частотой инвазивных заболеваний по сравнению с инфекциями, вызванными МБЛ-негативными изолятами [8-10].

Носительство МБЛ обычно коррелирует с определёнными генетическими линиями *P. aeruginosa*, клонами высокого эпидемического риска, которые обладают способностью приобретать и/или экспрессировать гены резистентности [11]. К международным клоном, обладающим множественной лекарственной устойчивостью, относятся сиквенс-типы (ST) 111, 175, 235 и др. [11]. Наиболее распространёнными МБЛ в мире являются ферменты типа VIM и IMP, гены которых локализованы на интегронах класса 1 [7,12]. Кроме генов МБЛ,

интегроны этого класса часто несут детерминанты резистентности к другим классам антибиотиков, в том числе к аминогликозидам и триметоприму [7]. Интегроны не являются самораспространяемыми мобильными генетическими элементами (МГЭ), они активно переносятся за счёт транспозонов, которые, в свою очередь, могут располагаться в плазмиде или хромосоме.

Мы описали генетическую структуру популяции карбапенемрезистентных (Карба-Р) клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в стационарах Москвы в 2012-2016 гг. [13]. Эта структура отличается доминированием небольшого числа международных клонов на фоне высокого разнообразия неродственных сиквенс-типов. Ведущим механизмом резистентности к карбапенемам у исследованных изолятов является продукция карбапенемазы VIM-2 [13]. В настоящем исследовании мы провели анализ генетического окружения гена *bla_{VIM-2}* и его взаимосвязи с клональными линиями, доминирующими в популяции Карба-Р *P. aeruginosa*.

Материал и методы. Карба-Р клинические изоляты *P. aeruginosa*, продуцирующие карбапенемазу VIM-2, выделены в трёх стационарах г. Москвы в период с 2012 по 2017 г. Для характеристики клональной структуры популяции использован метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>).

Аmplификацию и секвенирование *bla_{VIM}* проводили с использованием ранее описанных праймеров и условий [14]. Присутствие интегрона класса 1 определяли с использованием праймеров, специфических для 5' и

Праймеры для детекции и определения генетической структуры *bla_{VIM-2}*-несущих интегров

Название праймера	Последовательность праймера (5'–3')	Цель	Ссылка
5°CS	GCCTGTTCCGGTTCGTAAGCT	Аmplификация региона между 5°CS и <i>bla_{VIM}</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	[15]
tmiC	CGATCTCTGCGAAGAACTCG	Аmplификация региона между <i>bla_{VIM}</i> и <i>tmiC</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	[15]
VIM-F	AGTGGTGAGTATCCGACAG	Аmplификация региона между <i>bla_{VIM}</i> и <i>tmiC</i> или между <i>bla_{VIM}</i> и <i>sull</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	[16]
VIM-R	ATGAAAGTCCGTTGGAGAC	Аmplификация региона между 5°CS и <i>bla_{VIM}</i> или между <i>intI</i> и <i>bla_{VIM}</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	[16]
INT-FN	ATGCCCCGTTCCATACAGAAGCT	Аmplификация региона между <i>intI</i> и <i>bla_{VIM}</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	Данное исследование
Sul-RN	AACGCCGACTTCAGCTTTTGA	Аmplификация региона между <i>bla_{VIM}</i> и <i>sull</i> для детекции интегрона, RFLP и секвенирования	Данное исследование
VIM2-For	CGCTCAGTCGTTGAGTAG	Секвенирование региона между <i>bla_{VIM}</i> и <i>sull</i> или <i>tmiC</i>	[17]
VIM2-Rev	CTTACTCAAAAAGTTTGAACAT	Секвенирование региона между <i>intI</i> или 5°CS и <i>bla_{VIM}</i>	[17]
INT-For	CTTCYARAAAACCGAGGATGC	Секвенирование региона между <i>intI</i> и <i>bla_{VIM}</i>	[17]
QacF	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Секвенирование региона между <i>qacEΔ1</i> и <i>sull</i>	[17]
QacR	CGGATGTTGCGATTACTTCG	Секвенирование региона между <i>bla_{VIM}</i> и <i>qacEΔ1</i>	[18]

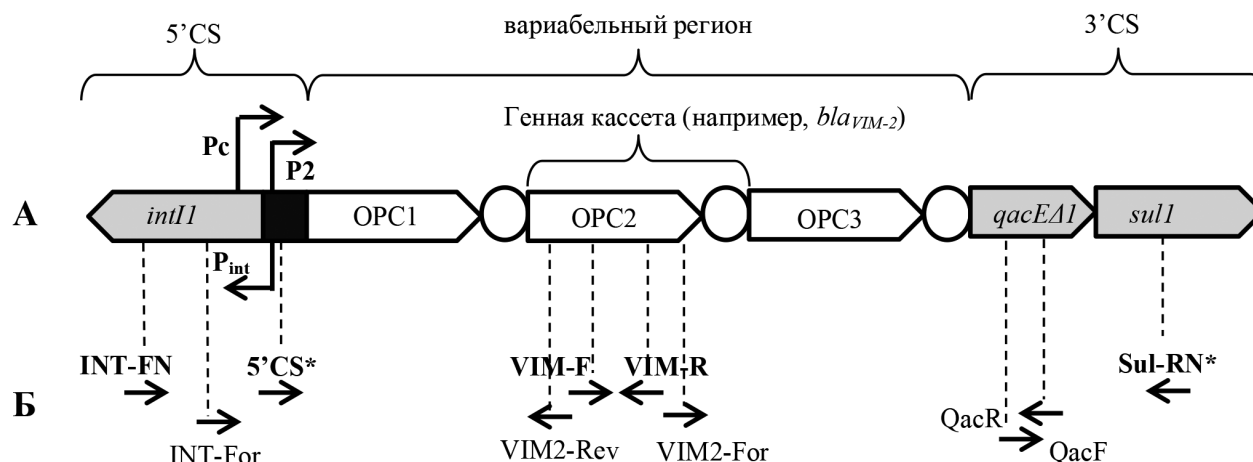


Рис. 1. Структура интегрона класса 1.

А – схема интегрона с тремя генными кассетами. Серые участки – концевые невариабельные регионы интегрона, черный прямоугольник – сайт интеграции *attI*, белые участки – высоковариабельный регион, включающий генные кассеты; кругами показаны рекомбинационные сайты *attC*. *Pc* и *P2* – кассетные промоторы, *P_{int}* – промотор интегразы; *OPC* – открытая рамка считывания. Б – места отжига праймеров.

3' консервативных сегментов интегрона (CS, conserved segment) и консервативных регионов *bla_{VIM}*. Для амплификации 5'-части использовали праймеры 5'CS/INT-FN и VIM-R, для амплификации 3'-части использовали праймеры VIM-F и *tniC*/Sul-RN (см. таблицу, рис. 1).

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism) применяли для анализа вариабельных регионов интегროнов класса 1, несущих *bla_{VIM}*-генную кассету. Для каждого интегрон-несущего изолята получали два ампликона (5'- и 3'-регион), которые подвергали обработке эндонуклеазой рестрикции TaqI (Thermo Fisher Scientific). Дальнейший анализ образующихся фрагментов проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле. От одного до пяти изолятов, представляющих каждый RFLP-тип, отбирали для секвенирования вариабельных регионов интегрона с использованием амплификационных праймеров и дополнительных праймеров для секвенирования (см. табл. 1, рис. 1). Структуру интегрона анализировали с использованием алгоритма BLAST, номер интегрона присваивали в соответствии с базой данных INTEGRALL [<http://integrall.bio.ua.pt>].

Результаты. Проанализированы 64 Карба-Р изолята, содержащих *bla_{VIM-2}*, которые относились к трём сиквентипам: ST654 (*n*=33), ST235 (*n*=19), ST111 (*n*=12). Методом рестрикционного анализа идентифицировано четыре RFLP-типа интегროнов (рис. 2). При помощи секвенирования репрезентативных изолятов удалось выявить пять типов интегროнов класса 1 (рис. 3).

Более 50% Карба-Р изолятов относились к RFLP-типу I (см. рис. 2). Эти изоляты несли интегрон типа In56 (GenBank AF191564) и обладали ST654. Этот интегрон содержал единственную генную кассету *bla_{VIM-2}*, связанную с резистентностью к бета-лактамам. Выявленный интегрон имел ряд отличий от референсной последовательности In56, в том числе он содержал два промотора *PcW* и *P2* с более высокой эффективностью экспрессии вместо одного «слабого» промотора *PcW*. Активная форма *P2*-промотора получена путём инсерции 3 п.о. в область гена *intI1*. 3'-последовательность выявленного

нами интегрона обладала необычной структурой, имея в своем составе участок 5'CS-региона и ген *sull*.

Карба-Р изоляты *P. aeruginosa* RFLP-типа II составляли 26% от выборки (см. рис. 2, 3); все они несли интегрон In559 (GenBank AM749810) и относились к ST235. Особенностью этого интегрона являлось отсутствие 3'CS-региона, обнаруживаемого у большинства интегროнов класса I в клинически значимых бактериях. Этот консервативный регион обычно включает гибридную генную кассету, несущую *qacE* и *sull*, в интактном виде опосредующих резистентность к четвертичным аммониевым соединениям и сульфаниламидам, соответственно [19]. Выявленный In559 в 3'-регионе содержал ген *tniC*, кодирующий резольвазу транспозона Tn5090 [14]. Кроме *bla_{VIM-2}*,

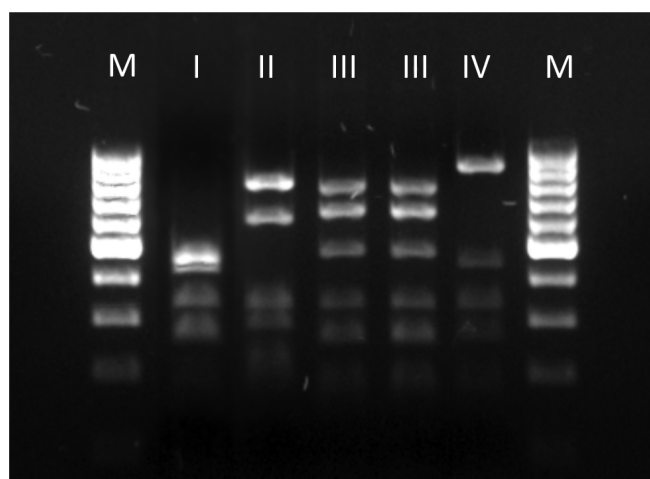


Рис. 2. RFLP-типы интегროнов.

М – маркер молекулярного веса; I – In56 (ST654, *n*=33); II – In559 (ST235, *n*=17); III – In59 (ST235, *n*=1) и In59-подобный (ST111, *n*=12); IV – In249 (ST235, *n*=1).




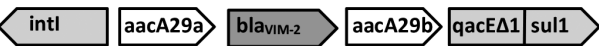

	N (%) изолятов	ST	Кассетный промотор	Варибельный регион (п.о.)	Структура интегрона
In56 (AF191564)	33 (52)	654	PcW/P2	1143	
In559 (AM749810)	17 (26)	235	PcH2	2713	
In59-подобный (KY860571)	12 (19)	111	PcS	2373	
In59 (AF263519)	1 (2)	235	PcS	2373	
In249 (AM087404)	1 (2)	235	PcS	1811	

Рис. 3. Распределение и генетическая структура *bla*_{VIM-2}-несущих интегронов.

Номера интегронов присвоены в соответствии с базой данных INTEGRALL. Номера референсных последовательностей в GeneBank представлены в скобках. Варибельный регион расположен между геном интегразы (*intI*) и 3'CS (conserved sequence, консервативная последовательность). 5' и 3'CS интегронов класса I выделены светло-серым цветом, а *bla*_{VIM-2} генные кассеты – темно-серым цветом

интегрон несёт гены аминогликозид-ацетилтрансферазы (*aacA7*, *aacA5*) и дигидрофолатредуктазы (*dfrB5*), опосредующие резистентность к аминогликозидам и триметоприму, соответственно (см. рис. 3).

In59-подобный интегрон выявлен у 12 (19%) Карба-Р изолятов (см. рис. 2, 3). Все изоляты относились к ST111 и имели RFLP-тип III. Описываемый интегрон включал *bla*_{VIM-2}, фланкированный генами аминогликозид-ацетилтрансферазы - *aacA29a* (см.рис.3). Референсный In59 (GenBank AF263519) в третьей позиции варибельного региона содержит *aacA29b* вместо *aacA29a*. Ферменты, кодируемые генами *aacA29a* и *aacA29b*, различались по четырём аминокислотам. Отличия от референсного In59 затронули некодирующие регионы: две и пять точечных мутаций в промоторном регионе PcS и *attC*-сайте первой генной кассеты (*aacA29a*), соответственно, и инсерция одной пары оснований в рекомбинационном сайте *attC* третьей генной кассеты. Секвенирование единственного ST235-изолята, относившегося к RFLP-типу III, показало типичную для In59 структуру: *aacA29a*/*bla*_{VIM-2}/*aacA29b*.

В одном Карба-Р ST235-изоляте с RFLP-типом IV выявлен редкий интегрон In249 (GenBank AM087404). Варибельный регион этого интегрона содержал две генные кассеты: *aacA4* и *bla*_{VIM-2}. В отличие от референсной последовательности In249, обнаруженный интегрон имел дубликацию 19 п.о. в *attC* сайте генной кассеты *aacA4*, связанной с резистентностью к аминогликозидам.

Обсуждение. Разнообразие МБЛ-кодирующих интегронов класса I изучено среди 64 продуцирующих карбапенемазу VIM-2 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в трёх стационарах г. Москвы. На фоне общего генетического разнообразия Карба-Р изолятов, *bla*_{VIM-2}-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* относились всего к трём клональным линиям (ST654, 235, 111).

Все ST654-изоляты относились к RFLP-типу I и несли интегрон In56. Согласно базе данных INTEGRALL, референсный интегрон этого типа содержит одну генную кассету, *bla*_{VIM-2}. Отличия от референсного интегрона состояли в особенностях генетического окружения генной кассеты, а именно в типе промотора и структуре 3'-региона интегрона. 3'-последовательность имела структуру, аналогичную структуре In1206 (GenBank KR337991), описанного в 2015 г. в изолятах, выделенных в Великобритании [20]. Подобный необычный 3'-регион, но с добавлением генной кассеты *aadB*, кодирующей аминогликозид-аденилтрансферазу, ранее обнаружен у ST654-изолята из Швеции, который, по-видимому, импортирован из Туниса [21].

В долговременном эпидемиологическом исследовании *P. aeruginosa* в Беларуси, Казахстане, России рост частоты Карба-Р изолятов в 2008-2010 г. г. связан с распространением доминирующего МБЛ-продуцирующего ST235-клона. Ген *bla*_{VIM-2} обнаружен у подавляющего большинства МБЛ-изолятов (99,6%) преимущественно в составе интегрона In559 (95,6%), у незначительной части изолятов выявлены интегроны In599, In340, In464, In620 (4,3%) [22]. Такая распространённость In559 среди ST235-изолятов характерна и для проанализированной популяции. Семнадцать из 19 Карба-Р ST235-изолятов несли интегрон In559 (GenBank AM749810). Отсутствие консервативного 3'CS-региона и наличие вместо него гена резольвазы *tniC* в составе In559 является характерной чертой интегронов класса I, входящих в состав Tn5090-подобных транспозонов. *bla*_{VIM-2}-содержащие интегроны с аналогичным составом генных кассет и структурой обнаружены ранее в изолятах, выделенных в России (GenBank AM749810, DQ522233), США (GenBank AY943084), Тайване, Норвегии (GenBank FM165436) [21-24], Монголии (GenBank KT768111) [25], Танзании (GeneBank KC630981) [26].

Впервые изолят с референсной структурой интегрона In59 выделен во Франции в 1998 г. (GenBank AF263519), затем в Австрии [27]. По данным MLST эти изоляты относились к CC111. Все ST111-изоляты, проанализированные в данном исследовании, относились к RFLP-типу III и несли *bla*_{VIM-2} в составе In59-подобного интегрона. Аналогичный состав и структура интегрона (*aacA29a/bla*_{VIM-2}/*aacA29a*) выявлены у продуцирующих VIM-2 ST111-изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в Чехии (GenBank KY860571) [28]. В нашей коллекции один изолят с классической структурой интегрона In59 относился к ST235.

Резистентность к карбапенемам одного ST235-изолята обусловлена наличием *bla*_{VIM-2} в составе интегрона In249. От референсной последовательности он отличался дупликацией в сайте *attC* генной кассеты *aacA4*. Такая особенность характерна для интегрона In238 из штамма SMART1130 *Serratia marcescens* (LC169580), выделенного в Чехии в 2013 году, и In259 из штамма IRPA-2 *Pseudomonas aeruginosa* (AY574992), выделенного в 2004 году в Китае. Китайский интегрон имел сходную последовательность варибельного региона в 3'-области. Аминокислотная последовательность кодируемой геном *aacA4* аминогликозид-6'-*N*-ацетилтрансферазы в составе интегрона In249 несла замены Leu90Ser и Gly71Ser по сравнению с In238 из штамма SMART1130 и In259 из штамма IRPA-2, соответственно. In238 и In249 также различались по типу VIM: интегрон из *Serratia marcescens* содержал генную кассету *bla*_{VIM-4}.

Несмотря на то что интегроны являются МГЭ и имеют механизмы для распространения в составе плазмид или транспозонов, большинство генов МБЛ «заякорены» в хромосоме [28]. Поскольку в настоящем исследовании не выявлено новых типов интегროнов и наблюдалась корреляция типа интегрона с определёнными ST, можно утверждать, что диссеминация клинически важных детерминант резистентности, таких как гены МБЛ, связана в первую очередь с клональным распространением генетических линий высокого эпидемического риска ST111, ST654 (100% изолятов этих ST являются носителями *bla*_{VIM-2}) и ST235 (65% изолятов этого ST являются носителями *bla*_{VIM-2}) [13]. Изменения в составе *bla*_{VIM-2}-несущих интегროнов, затрагивающие варибельные области, в том числе промоторные и рекомбинационные сайты, и приводящие к появлению новых интегронных структур, свидетельствуют о продолжающейся эволюции бактерий. Это обосновывает необходимость дальнейшего изучения МГЭ, их локализации и распространения в популяции клинически значимых бактерий, в том числе *P. aeruginosa*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00301).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 14-28 см. REFERENCES)

13. Савинова Т.А., Лазарева А.В., Шамина О.В., Крыжановская О.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Генотипы и носительство металло-β-лактамаз среди карбапенемрезистентных *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у детей в г. Москве. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(4): 370-4.

REFERENCES

1. Driscoll J.A., Brody S.L., Kollef M.H. The epidemiology, patho-

- genesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67: 351-68.
2. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22: 582-610.
3. Andrade S.S., Jones R.N., Gales A.C., Sader H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 140-1.
4. Lim T.P., Lee W., Tan T.Y. et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. *PLoS One*. 2011; 6: e28177.
5. Cabot G., Ocampo-Sosa A.A., Dominguez M.A., et al. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 6349-57.
6. Breidenstein E.B.M., de la Fuente-Nunez C., Hancock R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011; 19: 419-26.
7. Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11: 381-93.
8. Laupland K.B., Parkins M.D., Church D.L., Gregson D.B., Louie T.J., Conly J.M., Elsayed S., and Pitout J.D. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-β-lactamase (MBL)-producing strains. *J. Infect. Dis.* 2005; 192:1606-12.
9. Zavascki A.P., Barth A.L., Fernandes J.F., Moro A.L., Goncalves A.L., and Goldani L.Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital acquired pneumonia mortality in the era of metallo-β-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit. Care*. 2006; 10: R114.
10. Zavascki A.P., Barth A.L., and Goldani L.Z. Nosocomial bloodstream infections due to metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61:1183-5.
11. 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: 736-55.
12. Stokes H.W., Martinez E., Roy Chowdhury P. et al. Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67: 1799-800.
13. Savinova T.A., Lazareva A.V., Shamina O.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. Genotypes and metal-β-lactamases carriage in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children in Moscow. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(4): 370-4. (in Russian)
14. Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Shibayama K., Kato H., Kai K., Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(12): 5407-13.
15. 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: 2636-8.
16. Miriagou V., Tzelepi E., Gianneli D., and Tzouveleki L.S. *Escherichia coli* with a self-transferable, multi-resistant plasmid coding for the metallo-β-lactamase VIM-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 395-7.
17. Siarkou V.I., Vitti D., Protonotariou E., Ikonomidis A., Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(4): 1325-30.
18. Toleman M.A., Biedenbach D., Bennett D.M., Jones R.N., and Walsh T.R. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem?

- Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55: 61–70.
19. Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Rådström P., Sundström L., Sköld O., Swedberg G., Skurray R.A. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4): 761-8.
 20. Wright L.L., Turton J.F., Hopkins K.L., Livermore D.M., Woodford N. Genetic environment of metallo- β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015 Dec; 70(12): 3250-8.
 21. Samuelsen O., Toleman M.A., Sundsfjord A. et al. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 346–52.
 22. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S., Sukhorukova M.V., Pavlukov R.A., Kozlov R.S., Toleman M.A., Walsh T.R. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13(10): 867-76.
 23. Lolans K., Queenan A.M., Bush K., Sahud A., Quinn J.P. First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo- β -lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3538–40.
 24. Yan J.J., Hsueh P.R., Lu J.J., Chang F.Y., Ko W.C., Wu J.J. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 530–6.
 25. Baljin B., Baldan G., Chimeddorj B., Tulгаа K., Gunchin B., Sandag T., Pfeffer K., MacKenzie C.R., Wendel A.F. Faecal Carriage of Gram-Negative Multidrug Resistant Bacteria among Patients Hospitalized in Two Centres in Ulaanbaatar, Mongolia. *PLoS One.* 2016;11(12): e0168146.
 26. Moyo S., Haldorsen B., Aboud S., Blomberg B., Maselle S.Y., Sundsfjord A., Langeland N., Samuelsen Ø. Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is associated with sequence types 244 and 640 and the location of blaVIM-2 in a TniC integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(1): 682-5.
 27. Duljasz W., Gniadkowski M., Sitter S., Wojna A., and Jebelean C. First organisms with acquired metallo- β -lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 2221–2.
 28. Papagiannitsis C.C., Medvecky M., Chudejova K., Skalova A., Rotova V., Spanelova P., Jakubu V., Zemlickova H., Hrabak J. Czech Participants of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo- β -Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(12): e01811-7.

Поступила 16.05.19

Принята к печати 25.06.19