

Д.С. Баянбек<sup>1,2\*</sup>, Е.В. Жолдыбаева<sup>2</sup>, С.С. Қожахметова<sup>2</sup>,  
П.В. Тарлыков<sup>2</sup>, А. Бекбаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан

<sup>2</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Астана қ., Қазақстан

\*e-mail: aubakirova.dina28@gmail.com

## MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ӘДІСІМЕН *BACTEROIDES FRAGILIS* ШТАМЫНЫҢ АНТИБИОТИК РЕЗИСТЕНТТІЛІГІН АНЫҚТАУ

Зерттеу жұмысының негізгі мақсаты, жергілікті деңгейде, ауыр адамзат инфекцияларын емдеуде қарбапенем тәрізді кең қолданыстағы антимикробтық препаратқа қарсы Қазақстан өңірінен бөлініп алынған *Bacteroides fragilis* (BFR\_KZ01) клиникалық штаммының сезімталдығын бағалау болып табылады. Матрицалық көмекші лазерлік десорбция ионизациялау/ ұшу уақыты масс-спектрометрия әдісін пайдалана отырып, антибиотикке деген резистенттілікке жауап беретін гендерді анықтау. *Bacteroides fragilis* штаммының антибиотик резистенттілігіне жауапты *cfiA*-оңға мониторинг жүргізу және жаңа модулды анықтау мүмкіндігі үшін MALDI-TOF/МС масс-спектрометрия жүйесінде субтиптеу үшін бағдарламалық жасақтаманың MALDI Biotyper Subtyping Module жаңа модулі пайдаланылды.

Бактериалдық изолят Матрицалық көмекші лазерлік десорбция ионизациялау/ ұшу уақыты масс-спектрометрия MALDI-TOF МС мен 16S rRNA генің секвенирлеу әдісімен идентификацияланды. Штаммының интра-абдоминалды инфекцияны емдеу үшін кең қолданылатын антибиотиктерге (ципрофлоксацин, метронидазол, меропенем, клиндамицин және тетрациклин) деген сезімталдығы анықталды. Штамның *cfiA*-оң және *cfiA*-теріс анықтау үшін қажетті, масс-спектрлерді сараптау үшін ClinProTools 3.0.22 бағдарламалық жасақтама қолданылды. MALDI-TOF МС нәтижесі бойынша клиникалық BFR\_KZ01 штамды меропенемге деген фенотиптік сезімталдығына (орташа МИК шамасы – 1,3 мг/л) қарамастан, II топқа (*cfiA*-оң) жатқызды. Зерттеу нәтижесінде BFR\_KZ01 штамды *cfiA*, *nimB*, *tetQ* және *gyrA* гендеріне ие болуының арқасында метронидазол, тетрациклин мен ципрофлоксацин тәрізді көптеген антибиотикке резистентті екені дәлелденді.

**Түйін сөздер:** қарбапенем, *Bacteroides fragilis*, масс-спектрометрия, ген, инфекция.

D.S. Bayanbek<sup>1,2\*</sup>, E.V. Zholdybaeva<sup>2</sup>, S.S. Kozhahmetova<sup>2</sup>,  
P.V. Tarlykov<sup>2</sup>, A. Bekbaeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

<sup>2</sup>National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

\*e-mail: aubakirova.dina28@gmail.com

### Determining antibiotic resistance in *Bacteroides fragilis* strain using MALDI-TOF Mass Spectrometry

This study aimed to assess the susceptibility of a clinical strain of *Bacteroides fragilis* (BFR\_KZ01) from Kazakhstan, a significant anaerobic pathogen in human infections, to commonly used anti-anaerobic drugs at the local level. Additionally, the research aimed to identify genes with MALDI-TOF/MS associated with antibiotic resistance. To perform surveillance of *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* using new subtyping software module, MALDI Biotyper Subtyping Module, on MALDI-TOF MS system, and to evaluate the detection ability of the module. The bacterial isolate was identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing. Susceptibility to broad-spectrum antibiotics (metronidazole, meropenem, ciprofloxacin, clindamycin, and tetracycline) for intra-abdominal infections treatment was determined. ClinProTools 3.0.22 software was employed to analyze mass spectra groups crucial for identifying *cfiA*-positive strains. MALDI-TOF/MS analysis classified strain BFR\_KZ01 into Group II (*cfiA*-positive), despite being phenotypically sensitive to meropenem (mean MIC, 1.3 mg/L). The study identified drug resistance determinants in strain BFR\_KZ01, demonstrating its multidrug-resistant nature due to carrying *nimB*, *tetQ*, and *gyrA* genes, conferring resistance to metronidazole, tetracycline, and ciprofloxacin.

**Key words:** carbapenem, *Bacteroides fragilis*, mass-spectrometry, gene, infection.

Д.С. Баянбек<sup>1,2\*</sup>, Е.В. Жолдыбаева<sup>2</sup>, С.С. Қожахметова<sup>2</sup>,  
П.В. Тарлыков<sup>2</sup>, А. Бекбаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилев, г. Астана, Казахстан

<sup>2</sup>Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Казахстан

\*e-mail: aubakirova.dina28@gmail.com

### Определение устойчивости штамма *Bacteroides fragilis* к антибиотикам методом масс-спектрометрии MALDI-TOF

Цель данного исследования заключалась в оценке чувствительности клинического штамма *Bacteroides fragilis* (BFR\_KZ01) из Казахстана, значительного анаэробного патогена в человеческих инфекциях, к широко используемым антианаэробным препаратам на местном уровне. Кроме того, исследование направлено на выявление генов, связанных с сопротивлением антибиотикам с использованием масс-спектрометрии с лазерной ионизацией времени полета. Для проведения мониторинга *cfiA*-положительных *Bacteroides fragilis* с использованием нового модуля программного обеспечения для субтипирования, MALDI Biotyper Subtyping Module, на системе масс-спектрометрии MALDI-TOF MS, и для оценки возможности обнаружения данного модуля.

Бактериальный изолят был идентифицирован с использованием масс-спектрометрии с лазерной ионизацией времени полета и секвенирования гена 16S рПНК. Определена чувствительность к широкому спектру антибиотиков (метронидазолу, меропенему, цiproфлоксацина, клиндамицина и тетрациклина) для лечения интраабдоминальных инфекций. Программное обеспечение ClinProTools 3.0.22 использовалось для анализа масс-спектров, необходимых для выявления положительных по *cfiA* штаммов. Анализ MALDI-TOF/MS классифицировал штамм BFR\_KZ01 как принадлежащий к Группе II (положительный по *cfiA*), несмотря на фенотипическую чувствительность к меропенему (среднее МИК, 1.3 мг/л). Исследование выявило детерминанты устойчивости к препаратам у штамма BFR\_KZ01, подтверждающая его множественную устойчивость за счет наличия генов *nimB*, *tetQ* и *gyrA*, обеспечивающих сопротивление метронидазолу, тетрациклину и цiproфлоксацину.

**Ключевые слова:** карбапенем, *Bacteroides fragilis*, масс-спектрометрия, ген, инфекция.

#### Қысқартулар

МДТ – мульти дәрілік төзімділік; МИК – минималды ингибирлеуші концентрация; ИТ – инсерциондық тізбек; ПТР – полимераздық тізбекті реакция; ТГС – толық геномдық сиквенс; MALDI-TOF MS – матрицалық көмекші лазерлік десорбция ионизациялау/үшу уақыты масс-спектрометрия; НСП – негізгі спектрлік профильдер; КЗСИ – клиникалық және зертханалық стандарт институты; МБК – минималды бактериалық концентрациясы; MS – масс-спектрометрия; ИАИ – Интра-абдоминалды инфекция.

#### Кіріспе

*Bacteroides fragilis* шартты зардапты микроағза болып табылады және адам өміріне қауіпті, ауыр эндогенді инфекцияларды тудырады. *B. fragilis* адам ағзасының тоқ ішек флорасының тек 0,5% ғана құруына қарамастан, ол инфекцияның әр түрінде дерлік кездесетін ең маңызды грамм теріс анаэробты патоген болып табылады [1, 2]. *Bacteroides* туысының өкілдері, сонын ішінде *B. fragilis* бета-лактамадар мен бета-лактамаз ингибитор комбинациясына, анаэ-

робтармен байланысты инфекцияларды емдеу үшін қолданылатын клиндамицин, төртінші буынды фторхинолон, метронидазол немесе карбапенем тәрізді әртүрлі препараттарға жиі төзімділік танытады. Анаэроб бактериялардың ішінде *B. fragilis* штамдары антибиотикке біршама төзімді келеді [3], және олардың төзімділік деңгейі соңғы он жылдық аралықта қарқынды өсуде [4,5], сонымен бірге мульти дәрілік төзімділікке ие изоляттардың саны артып келеді [6-8]. *B. fragilis* штамымен туындайтын монобактериалық және аралас жұқпаларды емдеуде карбапенем біршама тиімді нұсқа болып табылады, бірақ соңғы уақытта карбапенемге деген төзімділік осы штамдар арасындағы маңызды мәселелердің бірі болып туындады. Антибиотик қысымының жоғарылауына байланысты 2000 жылдардан бері *B. fragilis* штамдары арасында карбапенемдердің МИК-сының аса жоғарылауының тұрақты үрдісі байқалды [9-11].

*B. fragilis*-тің карбапенемге деген төзімділік хромосомда орналасқан (тіпті ерекше жағдайлар сипатталған жағдайда да) *cfiA* (*ccrA* ретінде де белгілі) генімен кодталады [12] және екі бөліммен шетеледі. Ген экспрессиясы үшін тікелей *cfiA* генің алдында промотор ретінде жұмыс жасайтын инсерционды тізбектің (ИТ) арна-

йы элементтері қажет [13]. Төзімділік белігісін қадағалау барысында кездейсоқ таңдалынып алынған *B. fragilis*-тің клиникалық изоляттар хромосомасында *cfiA* генінің болуы (2,4–6,9 %) карбапенемге деген төзімділікпен (~1 %) салыстырғанда әлдеқайда жиі кездеседі [14]. Егер хромосоманың кез-келген бөлігінде кездесетін қажетті ИТ-элемент геннің жоғары ағынындағы тиісті аймағында орналасқан болса, үнсіздіктегі *cfiA* гені экспрессияланады, яғни карбапенемге деген төзімділік туындайтыны анықталған [13]. *CfiA* гені *B. fragilis*-те анықталынған, барлық бета-лактамы препаратырға, сонын ішінде барлық бета-лактамы комбинациясы мен бета-лактамаз ингибиторларға төзімділік тудыратын Амблер жіктеуі бойынша В санатына жататын өте қуатты периплазматикалық металло-бета-лактамаза, бірегей фермент – карбапенемазаны кодтайды [15]. *CfiA* гені үнсіздік күйінде, немесе әртүрлі деңгейлерде экспрессиялануы мүмкін, нәтижесінде сезімталдықтан төзімді фенотипке дейін карбапенемдердің МИК мәнін кең спектріне алып келеді [16]. Экспрессия деңгейі негізінен *cfiA* тізбегінен жоғары орнатқан кезде карбапенемаз экспрессиясын күшейтетін сыртқа бағытталған промоторлары бар әртүрлі ИТ-элементтерінің болуымен байланысты екені көрсетілген [17], дегенмен мұндай ИТ-элементтері жоқ төзімді штамдар да анықталынған [18]. *CfiA* таралуы жете бағаланбайды, себебі белсенді генге және жоғары МИК мәнге ие штамдар ғана сезімталдылық немесе бақылаудың қарапайым тестілеу көмегі арқылы анықталуы мүмкін. Дегенмен терапия барысында селективті қысымен МИК көрсеткіші төмен *cfiA*-оң штамдар генетикалық қайта құрылымға шалдығып, карбапенемге деген толық төзімділіктің туындауына алып келеді, нәтижесінде терапиялық сәтсіздік орын алады [19].

Анаэробтардың микробқа қарсы препаратырға деген сезімталдылықты анықтау мен сынау бойынша әдеттегі тәжірбие ел мен зертханаларға байланысты айырықшаланады. Зертханалардың көпшілігі әдетте анаэробты изолят басым патоген болған жағдайда осындай талдауларды резервке алады, өйткені дәстүрлі айқындау әдісі мен сезімталдылықты анықтау сынама-лары ұзақ уақытты, тәжірбиені талап етеді және түсінік беру, қайталау мен талдауда мәселе тудырады [20-22]. Қазіргі таңда *cfiA* генге ие штамдардың анықтау және олардың карбапенемаз өндірілуін растау үшін қажет әдеттегі құралдар кездеспейді. Карбапенемдерге деген резистент-

тілікті анықтаудың қарапайым әдістері анаэроб ағзалары үшін қолдану қарастырылмаған, сонымен қатар олардың өсу қарқыны өте баяу (24–48 сағ.) , сәйкесінше резистенттіліктің төмен деңгейін анықтауға қажетті сезімталдылыққа ие емес [23,24]. ПТР немесе ТГС тәрізді генотиптік әдістер күнделікті қолдану үшін сәйкес келмейді [25]. Матрицалық көмекші лазерлік десорбция ионизациялау/ ұшу уақыты масс-спектрометрияны айқындауға енгізу түрлік деңгейде анаэробтарды күнделікті сәйкестендіру айтарлықтай жақсарды, молекулалық әдістермен салыстырғанда нәтижелердің сапасы артты [26-28]. Сонымен қатар, MALDI-TOF MC әдісімен масс-спектрдегі сипаттама негізінде *B. fragilis*-ті I және II бөлімшеге дифференциялау мүмкіндігі дәлелденген, осылайша құрамында *cfiA* гені бар штамдар сәйкестендіру процесі кезінде тікелей анықталуы айқын [29].

Бұдан бөлек, сынама бактериялармен инкубациядан кейін антибиотик молекулаларының ыдырауын анықтау жолы арқылы карбапенеманың белсенділігін анықтау мүмкіндігі сипатталған [30]. Алайда, MALDI-TOF MC көмегімен фермент экспрессия деңгейі бойынша *cfiA* генге ие штамдарды сипаттау мүмкіндігі толық көрсетілмеген. Зерттеу жұмыстарының негізгі мақсаты, *B. fragilis*-те карбапенемге төзімділігін анықтау үшін MALDI-TOF MC негізіндегі тұтас диагностикалық тәсілдің күнделікті қолданылуын зерттеу болып табылады. Жұмыс процесі *B. fragilis* штамдарын сәйкестендіру, изоляттарды I және II бөлімшеге дифференциялау және карбапенемаз белсенділігін MALDI-TOF MC көмегімен растаудан құралған.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

Клиникалық штамм BFR\_KZ01 Астана қаласының Қалалық емханасының BFR\_1 сынама-сынан, «жіті гангрен-перфоративті аппендицит, перитонит» диагнозы қойылған 48 жастағы ер науқастан бөлініп алынған. Микроағзаны анжы көмегімен дренажды жаралардан алып, Эмиса коректік ортасы бар түтікшеге зондтарды батыру арқылы жиналды. *Bacteroides*-тің таза культурасын алу үшін барлық сынамалар эскулин-желатинді ортаға отырғызылып, анаэробты жағдайда 37°C температурада 48 сағат аралығында инкубацияланды.

Изоляттар матрицалық лазерлік десорбция және ионизациялаудың ұшу уақытты масс-спектрометриямен MALDI-TOF MC (Bruker

Daltonik GmbH, Бремен, Германия), сонымен бірге автоматтық жүйені (генетикалық анализатор 3730xl; Applied Biosystems) қолданумен 16S рРНК ген фрагментінің тікелей нуклеотидтық тізбегін анықтау жолымен де идентификацияланды. Бактериялық культуралар 30% глициринде -70°C температурда сақталды. Карбапенемге төзімділік қасиетіне жауапты *cfiA* генін идентификациялау үшін *ClinProTools 3.0.22* масс-спектрометрлік (Bruker Daltonik) бағдарламалық құралы *B. fragilis* бактериясын I және II бөлімшеге дифференциациялау үшін пайдаланылды. Барлық өлшем жұмыстары microflex1 LT MALDI-TOF масс-спектрометрінде 60 Гц лазер жиілігімен сызықтық оң ион режимінде орын алды. Масс диапазоны 2000- 20 000 Da құрады. Спектрлер автоматтық режимде түсірілді. *CfiA*- оң және *cfiA*-теріс спецификалық шыңын анықтау үшін *ClinProTools 3.0.22* бағдарламалық жақтамаға *B. fragilis* штамының *cfiA*-оң және *cfiA*-теріс масс-спектр тобы импортталынды. Жиналған спектрлерді қалыпқа келтіріп, калибрленді. Нәтижесінде шың тобтары, сонымен бірге шыңдардың жылжуы спектралды топтарды визуализациялау жолымен анықталған. Негізгі спектрлердің дендрограмасы MALDI Biotyper1 4.0 (Bruker Daltonik) пайдалану арқылы құрастырылды. BFR\_KZ01 изоляты MALDI-TOF көмегімен идентификациялауға ұшырады. Log.-балл мәні 2,0 жоғары болған жағдайда түрлік деңгейде идентификациялауды белгілейді. НСП дендрограмма жинақталған НСП пен НСП кітапханасымен салыстыру жолы арқылы туындаған. НСП кітапханасы анықтама кітапханасынан алынған *B. fragilis* 14 НСП -і енген. Сыртқы топ ретінде *Bacteroides ovatus*-тің эталондық НСП пайдаланылды.

Микробқа қарсы препаратқа сезімталдылықты Клиникалық және зертханалық стандарт институтының хаттамасына сәйкес сұйық ортада микросұйылту әдісімен өлшенді. Минималды ингибирлеуші концентрациясы бар планшеттер жеке тапсырыс бойынша Eiken Chemical Co., Ltd. компаниясымен әзірленді. Сезімталдылық КЗСИ анықтамасына сәйкес анықталынды. Меропенем және имипенем үшін МИК 4, 8 және 16 мг/мл сезімталды, аралық және резистентті болып анықталынды [31].

Меропенемге деген сезімталдылықты КЗСИ ұсынысына сәйкес, сұйық ортада сериялық сұйылту әдісін қолдана отырып анықталды. Барлық өлшемдер иммунологиялық зерттеу жұмыстарына арналған стерильді қақпағы (Корнинг)

бар 24-шұңқырлы планшеттерде (тегіс түбі бар) жүзеге асты. Ол үшін *B. fragilis*-тің МакФарланд стандарты бойынша 1 сәйкес келетін, 1% бактериялық суспензиясын 0,06-ден 64 мг/мл дейінгі әртүрлі көлемдегі меропенем концентрациясы бар бруцелла сұйық ортасына (*Brucella* broth (Himedia)) инокуляцияланды. Меропенем концентрациясы бар инокулумды дайындаған сәттен бастап 15 минут аралығы ішінде планшет шұңқырларына енгізілді.

Нәтиже есебі Cytation 5 (Cell imaging multi-mode reader, Biotek) спектрофотометрді пайдалана отырып, 600 нм толқын ұзындығымен, микроағзалардың антибиотик бар және жоқ кезіндегі өсу қарқының салыстыра отырып спектрофотометриялық зерттеумен жүргізілді. Минималды бактериялық концентрациясы культивирлеудің 48 сағатынан кейін анықталынды. Зерттелініп отырған штамның көрнекі өсуін толықтай тоқтатуын қамтамасыз ететін минималды концентрацияны МБК ретінде қабылданды. Меропенемнің субингибирлеуші концентрациясы 0,5 МБК ретінде қабылданды [32].

#### Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

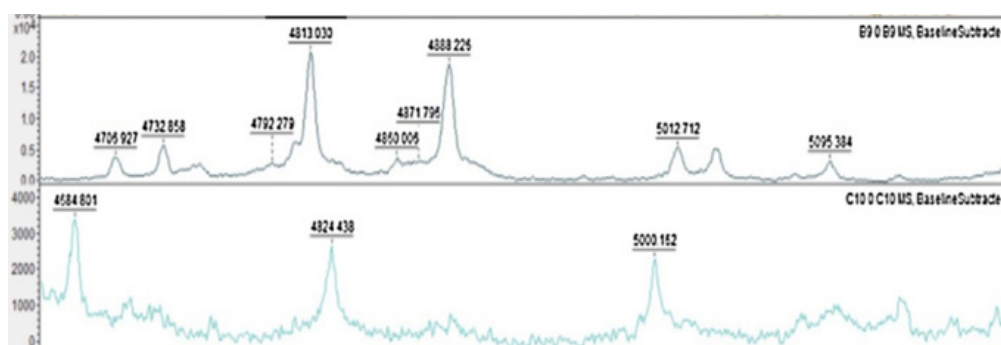
MALDI-TOF/МС және 16S рРНК секвенирлеу әдістердің көмегімен изолят *B. fragilis* ретінде индентификацияланды, және оған BFR\_KZ01 деген идентификациондық нөмір берілді. Нуклеотидтық тізбек BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) электрондық жүйені қолдану көмегімен сарапталынды. Бөлініп алынған *B. fragilis* изолятының 16S рРНК фрагментінің нуклеотидтық тізбегі *B. fragilis* S14 (CP012706.1) штамының 16S рРНК фрагментінің нуклеотидтық тізбегіне 99,73% шамасында дәлме-дәл және дәл осындай жағдай *B. fragilis* BOB25 (CP011073.1) штамы мен *B. fragilis* JCM 17587 (AB618793.1) штамында да көрініс табады. MALDI-TOF/МС көмегімен идентифирленген BFR\_KZ01 штамы 2,059 бағалауға ие. MALDI масс-спектрометрдің бірнеше өлшемдерінен тұратын спектр топтамасы негізгі спектрлік профильдер деп аталатындарды есептеуге мүмкіндік туғызады. НСП дендрограммасы *B. fragilis*-тің таңдалынып алынған НСП арасындағы тығыз байланысты анықтады. BFR\_KZ01 штамының негізгі спектрі анықтамалық кітапханадағы *B. fragilis* ENR\_0039 штамымен тығыз байланысты.

Клиникалық BFR\_KZ01 штамының ИАИ-ны емдеу үшін кең қолданылатын бес антибиотикке (ципрофлоксацин, метронидазол, меропенем,

клиндамицин және тетрациклин) деген антимикробтық сезімталдығы келесі шамаларды көрсетті: штамм клиндамицинге (орташа МИК 0,12 мг/л) және меропенемге (орташа МИК 1,3 мг/л) сезімтал екені және тетрациклинге (МИК > 16 мг/л), ципрофлоксацинге (МИК > 32 мг/л) және метронидазолға (МИК > 256 мг/л) төзімді болып келді. Салипанте және басқалары *B. fragilis*-тің МДТ (метронидазол және карбапенемге төзімді) түрін бөліп алды және оны ТГС деректері негізінде *Bacteroides*-тің жаңа геномотүрі ретінде идентификациялады [33]. *B. fragilis* бактериясының молекулярлық сипатамалары негізінде Сарвари және басқалары Венгрия мемлекетінде

МДТ штамдарының пайда болуын көрсетті [34]. Зерттеу жұмыстарының авторлары *B. fragilis* топтарының изоляттары арасында антимикробтық препаратқа деген сезімталдығын талдау және бақылау қажетілігі туралы атап өткен. Антибиотикке деген бактериялардың төзімділігінің өсуі ем-шаралардың тиімсіздігінің және аса жоғары өлім көрсеткішінің себебі болуы мүмкін.

*CfiA* кездесуін масс-спектрометриялық анализ көмегімен анықталыны. BFR\_KZ01 изолятында карбапенемге төзімділігінің жоғарылау қауіпін бағалау үшін ClinProTools 3.0.22 бағдарлама көмегімен *cfiA* генің тасымалдаушылар анықталыны (1-сурет).



1-сурет – 4500-5500 Da диапазонында *Bacteroides fragilis*-тың *cfiA*-теріс (а) және *cfiA*-он (б) штамдары арасындағы МС шыңдарының дифференциациясы

Осылайша, 4500-5500 Da диапазонында МС шыңдарын сарапатай отыра олардың *cfiA*-терістен *cfiA*-он штамдарға: 4706-тен 4684 Da дейін; 4813-тен 4824 Da дейін; және 5012-тен 5000 Da дейін жылжуын бақылауға болады [35]. Сонымен, MALDI-TOF/МС нәтижесі бойынша BFR\_KZ01 штамы II тобына (*cfiA*-он) жатқызылды. Алайда, біздің болжам бойынша бергілген штамдағы *cfiA* гені үнсіз күйінде, өйткені оның карбапенем-меропенемге деген фенотиптік төзімділігі көрініс таппады. Джеверик және басқаларының зерттеу жұмыстарында *cfiA* генінің үнсіз күйі туралы әуелде мәлімделген [36].

### Қорытынды

Зерттеу жұмыстарының нәтижесі *Bacteroides fragilis* топ тармағын анықтау және маңызды төзімділік механизмінің болуын анықтау үшін MALDI-TOF МС техникасының пайдалығын дәлелдейді. Берілген анаэробты патоген дүниежүзі бойынша өте жиі бөлінеді және MALDI-TOF МС пайдалану арқылы *B.*

*fragilis* штамдары I және II бөлімшеге сәтті дискриминацияның арқасында карбапенемге қарсы фенотиптік төзімділіктің барын болжауға мүмкіндік тудырады.

*B. fragilis* түрін идентификациялау үшін және изоляттардың карбапенемаза белсенділігінің деңгейін анықтауға арналған MALDI-TOF МС негізіндегі жаңа толық жұмыс процесі әдеттегі тәжірибе үшін қазіргі таңдағы қолжетімді әдістермен салыстырғанда біршама нақты болып табылды. Бұл тәсіл көмегімен *B. fragilis* -тің карбапенемаз белсенділігін анықтау әлдеқайда жылдам, тек 2 сағат аралығын құрайды.

Дегенмен, *cfiA* оң геномды *B. fragilis* штамдарың барлығы дерлік карбапенемге деген төзімділікке ие болады, тек кейбір түрлеріне *cfiA* гені үнсіз күйде кездеседі, яғни геннің толық экспрессиясы үшін сәйкесінше ИТ-элементін иелену қажет. MALDI-TOF МС техникасын пайдалану *B. fragilis*-тің маңызды антибиотиктерге деген төзімділігін анықтау үшін клиникалық микробиология зертханаларында құнды құрылымы болып табылады.

Зерттеу қорытындысы бойынша Қазақстан өңірінен бөлініп алынған *B. fragilis* BFR\_KZ01 штамы құрамында *cfiA*, *nimB*, *tetQ* және *gyrA* гендері кездесетіні анықталынды. BFR\_KZ01 изоляты метронидазол, тетрациклин және ципрофлоксацин антибиотиктеріне төзімділігін қамтамасыз ететін гендердің идентифицирленуін есепке ала отырып, МДТ штамы деп сипаттауға болады. Бұл штамының *cfiA* гені «үнсіздік» күйінде, себебі меропенемге деген фенотиптік төзімділік бейнеленбеген.

## Мүдделер қақтығысы

Мақаланың барлық авторлары мәтінмен толық танысқан, мүдделер қақтығысына ие емес.

## Қаржыландыру көзі

Зерттеу жұмыстары Қазақстан Республикасының Ғылым және білім министрлігінің қаржыландыруымен жүзеге асырылған (AP09258813, AP05130984 грант).

## Әдебиеттер

1. Wexler H.M., Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty // *Clinical microbiology review*. – 2007. – Vol. 20. – P. 593-621.
2. Brook I., Spectrum and treatment of anaerobic infections // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 22. – P. 1-13.
3. Hecht D.W., Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39. – P. 92-97.
4. Nagy E., Urban E., Nord C.E., ESCMID E.S.G.o.A.R.i.A.B., Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience // *Clinical Microbiology Infection*. – 2011. – Vol. 17. – P. 371-379.
5. Hedberg M., Nord C.E., Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe // *Clinical Microbiology Infection*. – 2003. – Vol. 9. – P. 475-488.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* - Seattle, Washington // *Morbidity and mortality Weekly Report*. – 2013. – Rep. 62. – P. 694-696.
7. Hartmeyer G.N., Soki J., Nagy E., Justesen U.S., Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? // *Journal Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 61. – P. 1784-1788.
8. Soki J., Hedberg M., Patrick S., Balint B., Herczeg R., Nagy I., Hecht, D.W., Nagy E., Urban E., Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71. – P. 2441-2448.
9. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Golan Y., Goldstein E.J.C., Harrell L., Jenkins S., Newton D., Pierson C., Rosenblatt J., Venezia R., Gorbach S.L., Queenan A.M., Hecht D.W., Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009 // *Anaerobe*. – 2011. – Vol. 17. – P. 147-151.
10. Liu C.Y., Huang Y.T., Liao C.H., Yen L.C., Lin H.Y., Hsueh P.R., Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – P. 3161-3168.
11. Hawser S.P., Hackel M., Hoban D.J., Antibiotic susceptibility profiles of European *Bacteroides fragilis* with reduced carbapenem susceptibility // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 65. – P. 803-804.
12. Goto T., Tanaka K., Minh Tran C., Watanabe K., Complete sequence of pBFUK1, a carbapenemase-harboring mobilizable plasmid from *Bacteroides fragilis*, and distribution of pBFUK1-like plasmids among carbapenem-resistant *B. fragilis* clinical isolates // *The Journal of Antibiotics*. – 2013. – Vol. 66. – P. 39-242.
13. Podglajen I., Breuil J. & Collatz E., Insertion of a novel DNA sequence, 1S 1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* // *Molecular Microbiology*. – 1994. – Vol. 12. – P. 105-114.
14. Nagy, E., Anaerobic infections: update on treatment considerations // *Drugs*. – 2010. – Vol. 70. – P. 841-858.
15. Rasmussen B.A., Bush K., Tally F.P., Antimicrobial resistance in *Bacteroides* // *Clinical Infectious Diseases*. – 1993. – Vol. 16(4). – P. 390-400.
16. Eitel Z., Soki J., Urban E., Nagy E., ESCMID Study Group on Anaerobic Infection, the prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries // *Anaerobe*. – 2013. – Vol. 21. – P. 43-49.
17. Soki J., Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides* // *World Journal of Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1-12.
18. Soki J., Edwards R., Urban E., Fodor E., Beer Z., Nagy E., Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant *Bacteroides* strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms // *International journal of Antimicrobial Agents*. – 2004. – Vol. 24. – P. 450-454.
19. Soki J., Edwards R., Hedberg M., Fang H., Nagy E., Nord C.E. Examination of *cfiA*- mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey // *International journal of Antimicrobial Agents*. – 2006. – Vol. 28. – P. 497-502.

20. Finegold S.M., Perspective on susceptibility testing of anaerobic bacteria, // *Clinical Infectious Diseases*. – 1997. – Vol. 25 (2). – P. 251-253.
21. Goldstein E.J.C., Citron D.M., Goldman P.J., Goldman R.J., National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III // *Anaerobe*. – 2008. – Vol. 14. – P. 68-72.
22. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. (2012) M11A8-Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m11/>. (Accessed 17 December 2017).
23. Bogaerts P., Engelhardt A., Berhin C., Bylund L., Ho P., Yusof A., Glupczynski Y., Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. – Vol.14. – P. 973-977.
24. Schwensen A.S., Acar Z., Sydenham T.V., Johansson A.C., Justesen U.S., Phenotypic detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase in *Bacteroides fragilis* with the meropenem-EDTA double-ended Etest and the ROSCO KPC/MBL Confirm Kit // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 72 (2). – P. 437-440.
25. Sydenham T.V., Soki J., Hasman H., Wang M., Justesen U.S., ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections), Identification of antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant clinical *Bacteroides fragilis* isolates by whole genome shotgun sequencing // *Anaerobe*. – 2015. – Vol. 31. – P. 59-64.
26. Handal N., Bakken Jorgensen S., Smith Tunsjo H., Johnsen B.O., Leegaard T.M., Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles // *APMIS Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*. – 2015. – Vol. 123. – P.749-758.
27. Kostrzewa M., Nagy E., How MALDI-TOF mass spectrometry can aid diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2016. – Vol. 16. – P. 509-511.
28. Rodríguez-Sánchez B., Alcalá L., Marín M., Ruiz A., Alonso E., Bouza E., Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria // *Anaerobe*. – 2016. – Vol. 42. – P. 101-107.
29. Nagy E., Becker S., Soki J., Urban E., Kostrzewa M., Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Journal of Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 60. – P. 1584-1590.
30. Johansson A., Nagy E., Soki J., ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections), Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) // *Anaerobe*. – 2014. – Vol. 26. – P. 49-52.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2021) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, in: CLSI Supplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute.
32. de Freitas M.C.R. et al., Exploratory Investigation of *Bacteroides fragilis* Transcriptional Response during In vitro Exposure to Subinhibitory Concentration of Metronidazole // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-13.
33. Salipante S., Kalapila A., Pottinger P., Hoogestraat D., Cummings L., Duchin J., et al., Characterization of a multidrug-resistant, novel *Bacteroides* genomospecies // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 21. – P. 95-98.
34. Sárvári K., Sóki J., Kristóf K., Juhász E., Miszti C., Zsóka S., et al., Molecular characterisation of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. – 2018. – Vol. 13. – P. 65-69.
35. Nagy E., Becker S., Sóki J., Urbán E., Kostrzewa M., Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Journal of Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 60. – P. 1584-90.
36. Jeverica S., Sóki J., Mueller Premru M., Nagy E., Papst L., High prevalence of division II (*cfiA* positive) isolates among blood stream *Bacteroides fragilis* in Slovenia as determined by MALDI-TOF MS // *Anaerobe*. – 2019. – Vol. 58. – P. 30-34.

## References

1. Brook I. (2016) Spectrum and treatment of anaerobic infections, *J. Infect. Chemother.*, vol. 22, pp. 1-13.
2. Bogaerts P., Engelhardt A., Berhin C., Bylund L., Ho P., Yusof A., Glupczynski Y. (2008) Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*, *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 14, pp. 973-977.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013) Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*, Seattle, Washington, *MMWR Morb. Mortal. Wkly.*, rep. 62, pp. 694-696.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2021) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, in: CLSI Supplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. (2012) M11A8-Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m11/>. (Accessed 17 December 2017).
6. de Freitas M.C.R. et al. (2016) Exploratory Investigation of *Bacteroides fragilis* Transcriptional Response during In vitro Exposure to Subinhibitory Concentration of Metronidazole, *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp.1-13.
7. Eitel Z., Soki J., Urban E., Nagy E. (2013) ESCMID Study Group on Anaerobic Infection, the prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries, *Anaerobe*, vol. 21, pp. 43-49.
8. Finegold S.M. (1997) Perspective on susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Clin. Infect. Dis.*, vol. 25 (Suppl 2), pp. 251-253.

9. Goldstein E.J.C., Citron D.M., Goldman P.J., Goldman R.J. (2008) National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III, *Anaerobe*, vol. 14, pp. 68-72. Goto T., Tanaka K., Minh Tran C., Watanabe K.. (2013) Complete sequence of pBFUK1, a carbapenemase-harboring mobilizable plasmid from *Bacteroides fragilis*, and distribution of pBFUK1-like plasmids among carbapenem-resistant *B. fragilis* clinical isolates, *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 66, pp. 239-242.
10. Handal N., Bakken Jorgensen S., Smith Tunsjo H., Johnsen B.O., Leegaard T.M. (2015) Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol.*, vol. 123, pp. 749-758.
11. Hartmeyer G.N., Soki J., Nagy E., Justesen U.S. (2012) Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? *J. Med. Microbiol.*, vol.61, pp. 1784-1788.
12. Hawser S.P., Hackel M., Hoban D.J.. (2010) Antibiotic susceptibility profiles of European *Bacteroides fragilis* with reduced carbapenem susceptibility, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 65, pp. 803-804.
13. Hedberg M., Nord C.E. (2003) Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe, *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 9, pp. 475-488.
14. Hecht D.W. (2004) Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments, *Clin. Infect. Dis.*, vol. 39, pp. 92-97.
15. Jeverica S., Sóki J., Mueller Premru M., Nagy E., Papst L. (2019) High prevalence of division II (cfiA positive) isolates among blood stream *Bacteroides fragilis* in Slovenia as determined by MALDI-TOF MS. *Anaerobe*, vol. 58, pp. 30-4.
16. Johansson A., Nagy E., Soki J. (2014) ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections), Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Anaerobe*, vol. 26, pp. 49-52.
17. Kostrzewa M., Nagy E. (2016) How MALDI-TOF mass spectrometry can aid diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 16, pp. 509-511.
18. Liu C.Y., Huang Y.T., Liao C.H., Yen L.C., Lin H.Y., Hsueh P.R. (2008) Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, pp. 3161-3168.
19. Nagy E. (2010) Anaerobic infections: update on treatment considerations. *Drugs*, vol. 70, pp. 841-858.
20. Nagy E., Becker S., Sóki J., Urbán E., Kostrzewa M. (2011) Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol.*, vol. 60, pp.1584-90.
21. Nagy E., Becker S., Soki J., Urban E., Kostrzewa M. (2011) Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, pp. 1584-1590.
22. Nagy E., Urban E., Nord C.E. (2011) ESCMID study group on antimicrobial resistance in anaerobic bacteria, antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience, *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, pp. 371-379.
23. Podglajen I., Breuil J., Collatz E. (1994) Insertion of a novel DNA sequence, IS 1186, upstream of the silent carbapenemase gene cfiA, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol.*, vol. 12, pp. 105-114.
24. Rasmussen B.A., Bush K., Tally F.P.. (1993) Antimicrobial resistance in *Bacteroides*, *Clin. Infect. Dis.*, vol.16 suppl. 4, pp. 390-400.
25. Rodríguez-Sánchez B., Alcalá L., Marín M., Ruiz A., Alonso E., Bouza E. (2016) Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria, *Anaerobe*, vol. 42, pp. 101-107.
26. Salipante S., Kalapila A., Pottinger P., Hoogestraat D., Cummings L., Duchin J., et al. (2015) Characterization of a multi-drug-resistant, novel *Bacteroides* genomospecies. *Emerg Infect Dis.*, vol. 21, pp. 95-8.
27. Sárvári K., Sóki J., Kristóf K., Juhász E., Miszti C., Zsóka S., et al. (2018) Molecular characterisation of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist.*, vol. 13, pp. 65-9.
28. Schwensen A.S., Acar Z., Sydenham T.V., Johansson A.C., Justesen U.S. (2017) Phenotypic detection of the cfiA metallo- $\beta$ -lactamase in *Bacteroides fragilis* with the meropenem-EDTA double-ended Etest and the ROSCO KPC/MBL Confirm Kit, *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (2) pp. 437-440.
29. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Golan Y., Goldstein E.J.C., Harrell L., Jenkins S., Newton D., Pierson C., Rosenblatt J., Venezia R., Gorbach S.L., Queenan A.M., Hecht D.W. (2011) Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009, *Anaerobe*, vol. 17, pp. 147-151.
30. Soki J. (2013) Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*, *World J. Clin. Infect. Dis.*, vol. 3, pp. 1-12.
31. Soki J., Edwards R., Hedberg M., Fang H., Nagy E., Nord C.E. (2006) ESCMID study group on antimicrobial resistance in anaerobic bacteria, examination of cfiA-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey, *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 28, pp. 497-502.
32. Soki J., Edwards R., Urban E., Fodor E., Beer Z., Nagy E. (2004) Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant *Bacteroides* strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 24, pp. 450-454
33. Soki J., Hedberg M., Patrick S., Balint B., Herczeg R., Nagy I., Hecht D.W., Nagy E., Urban E. (2016) Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, pp. 2441-2448.



34. Sydenham T.V., Soki J., Hasman H., Wang M., Justesen U.S. (2015) ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections), Identification of antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant clinical *Bacteroides fragilis* isolates by whole genome shotgun sequencing, *Anaerobe*, vol. 31, pp. 59-64.

35. Wexler H.M. (2007) *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty, *Clin. Microbiol., rev.* 20, pp. 593-621.

**Авторлар туралы мәлімет:**

Баянбек Дина Сериковна – PhD студент, ғылыми қызметкер, «Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті»; «Ұлттық биотехнология орталығы» (Астана, Қазақстан, aubakirova.dina28@gmail.com)

Жолдыбаева Елена Витальевна – б.ғ.к., қауымдастырылған профессор, зертхана меңгерушісі, «Ұлттық биотехнология орталығы» (Астана, Қазақстан, zholdybaeva@biocenter.kz)

Қожахметова Сания Саттыбаева – б.ғ.к., қауымдастырылған профессор, аға ғылыми қызметкер, «Ұлттық биотехнология орталығы» (Астана, Қазақстан, kozhakhmetova@biocenter.kz)

Тарлыков Павел Викторович – PhD, зертхана меңгерушісі, «Ұлттық биотехнология орталығы» (Астана, Қазақстан, tarlykov@biocenter.kz)

Бекбаева Аяжан – магистр, кіші ғылыми қызметкер, «Ұлттық биотехнология орталығы» (Астана, Қазақстан, aika\_bekbaeva@mail.ru)

**Information about authors:**

Bayanbek Dina Serikovna – PhD student, researcher, «L.N. Gumilyov Eurasian National University»; «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan, aubakirova.dina28@gmail.com)

Zholdybaeva Elena Vitalevna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Laboratory, «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan, zholdybaeva@biocenter.kz)

Kozhakhmetova Saniya Sattybaevna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Senior researcher, «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan, kozhakhmetova@biocenter.kz)

Tarlykov Pavel Victorovich – PhD, Head of Laboratory, «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan, tarlykov@biocenter.kz)

Bekbaeva Ayazhan – magister, Junior researcher, «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan, aika\_bekbaeva@mail.ru)

Келіп түсті 12 ақпан 2024 жыл  
Қабылданды 20 қараша 2024 жыл