

Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз

Попов Д.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:
Дмитрий Александрович Попов
Эл. почта: da_popov@inbox.ru

Ключевые слова: резистентность, карбапенемазы, методы диагностики.

Широкое распространение «новых», связанных с продукцией карбапенемаз, механизмов резистентности грамотрицательных бактерий делает актуальными вопросы использования на практике соответствующих диагностических подходов, необходимых для выбора эффективных режимов антибактериальной терапии. В данной статье представлена сравнительная характеристика наиболее известных в настоящее время методов определения продукции карбапенемаз.

Review

Comparative review of the modern methods for carbapenemases detection

Popov D.A.

A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia

Contacts:
Dmitry A. Popov
E-mail: da_popov@inbox.ru

Key words: resistance, carbapenemases, diagnostics.

Recent emergence and spread of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria that hydrolyze most β -lactams, including carbapenems, are a major concern for antimicrobial therapy worldwide, including Russia. This paper presents a comparative review of the currently available methods for carbapenemases detection.

Введение

Устойчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам является растущей глобальной проблемой современности. Особую тревогу вызывает появление и широкое распространение грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам, которые до недавнего времени оставались надежными препаратами в большинстве клинических ситуаций [1–3]. Устойчивость энтеробактерий к карбапенемам может быть связана с гиперпродукцией хромосомных бета-лактамаз AmpC или бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) в сочетании с нарушением проницаемости клеточной стенки (потеря пориновых каналов), а также с ферментативной инактивацией антибиотика за счет продукции карбапенемаз [4].

В соответствии с классификацией Ambler, выделяют 4 молекулярных класса бета-лактамаз: сериновые (A, C, D) и металл-бета-лактамазы (МБЛ), имеющие атом цинка в активном центре (B). Ферменты типа AmpC (молекулярный класс C), характерные для энтеробактерий и *Pseudomonas aeruginosa*, демонстрируют преимущественно гидролиз цефалоспоринов. Класс A представлен рядом ферментов различного субстратного профиля, включая БЛРС, обуславливающие устойчивость

энтеробактерий ко всем бета-лактамам антибиотикам, кроме карбапенемов, а также карбапенемазы KPC и GES, встречающиеся у энтеробактерий и *P. aeruginosa*. Класс D включает карбапенемазы типа OXA, характерные для представителей порядка Enterobacterales и ацинетобактера. МБЛ (IMP, VIM, NDM) встречаются преимущественно у *P. aeruginosa* и энтеробактерий, имеют широкий спектр гидролитической активности, включая карбапенемы, но они неактивны в отношении монобактамов [5].

Лечение инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами, в том числе продуцентами карбапенемаз, вызывает значительные трудности из-за крайне ограниченного арсенала эффективных препаратов и сопровождается рядом негативных последствий, среди которых увеличение сроков госпитализации, ухудшение исходов лечения, а также рост прямых и непрямых затрат [6]. Недавно в России появилась возможность использования по широкому перечню клинических показаний нового комбинированного препарата, содержащего цефтазидим и авибактам, ингибирующий БЛРС, бета-лактамазы AmpC, а также ряд сериновых карбапенемаз. Однако данный препарат неактивен в отношении

ряда карбапенемаз молекулярного класса D (за исключением ОХА-48), а также МБЛ [7], что требует проведения прецизионной микробиологической диагностики при его применении.

Таким образом, при выборе режимов антибиотикотерапии инфекций, вызванных полирезистентными грам-отрицательными бактериями, следует учитывать возможность продукции ими карбапенемаз. Вместе с тем на первый план выходит необходимость быстрого выявления данного механизма, а также определения молекулярного типа фермента – как для оптимизации лечения, так и в целях инфекционного контроля.

В настоящее время во всем мире наибольшее распространение у энтеробактерий имеют сериновые карбапенемазы молекулярных типов ОХА-48 и КРС, а также МБЛ типа NDM. Для *P. aeruginosa* характерна продукция МБЛ типов VIM и в меньшей степени IMP. Устойчивость к карбапенемам у *Acinetobacter baumannii* может быть обусловлена ферментами типа ОХА-23 и подобными [8]. Преваляирование тех или иных молекулярных типов карбапенемаз зависит от региона. Так, в Западной Европе и США у карбапенеморезистентных энтеробактерий чаще выделяются носители гена *blaKPC*, тогда как в РФ преобладают продуценты карбапенемаз ОХА-48 (78,2%) и NDM (20%), а также их комбинации (1,5%) [9, 10].

Современные методы детекции карбапенемаз можно подразделить на фенотипические, аналитические и молекулярно-генетические. Фенотипический скрининг продукции карбапенемаз основан на выявлении сниженного диаметра зоны задержки роста тестируемого штамма при определении чувствительности к карбапенемам диско-диффузионным методом или повышенного значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) карбапенемов. Для скрининга рекомендовано использовать меропенем. Результат считают положительным, если он выходит за пределы эпидемиологической точки отсечения, при этом тестируемый штамм по клиническим критериям интерпретации может оставаться в категории «чувствительный». С использованием соответствующих ингибиторов/маркеров (ЭДТА, фенилбороновой кислоты, клоксацилина, темоциллина) фенотипически также возможно дифференцировать сериновые карбапенемазы и МБЛ, а также предположительно оценить тип сериновых карбапенемаз. Аналитические методы позволяют выявить факт наличия фермента. К ним относятся косвенное или прямое определение гидролиза карбапенемов (метод инактивации карбапенемов, Carba NP тест, методика с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии, спектрофотометрия), а также иммунохроматографические латеральные тесты. Условно к аналитическим методам можно отнести и тест Ходжа. Точное определение типа карбапенемаз осуществляется молекулярно-генетическими методами, среди которых наибольшее распространение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени.

Упомянутые выше методы различаются по назначению, диагностической ценности, скорости получения результата, легкости практической реализации и стоимости. Целью настоящей статьи является описание ус-

ществующих в настоящее время методов определения продукции карбапенемаз, а также оптимального клинического алгоритма их применения на практике.

Первичный скрининг продукции карбапенемаз

При рутинном исследовании чувствительности энтеробактерий к карбапенемам, в случаях если МПК препарата или диаметр зоны задержки роста вокруг диска с карбапенемом (обычно с меропенемом) выходит за пределы эпидемиологической точки отсечения (МПК меропенема > 0,125 мг/л, диаметр зоны задержки роста вокруг диска с меропенемом < 28 мм), следует запозднить продукцию карбапенемаз и подвергнуть данный штамм исследованию подтверждающими методами. Исключением являются ситуации, когда диаметр зоны задержки роста вокруг диска с меропенемом находится в диапазоне 25–27 мм, но штамм сохраняет чувствительность к пиперациллину/тазобактаму и/или темоциллину [11]. Проведение первичного скрининга продукции карбапенемаз с последующим применением подтверждающих методов целесообразно в случае невысокой частоты выделения карбапенеморезистентных штаммов и преимущественно в целях эпидемиологического наблюдения, когда скорость получения результата не является принципиальной.

Метод комбинированных дисков (карбапенем + ингибитор)

Данный фенотипический метод позволяет подтвердить продукцию карбапенемаз исследуемым изолятом, а также предположить их молекулярный тип. Метод основан на использовании специфических ингибиторов карбапенемаз. Так, бороновая кислота является ингибитором карбапенемаз класса А (КРС), ЭДТА и дипикколиновая кислота ингибируют МБЛ класса В (NDM, VIM, IMP). Специфический ингибитор карбапенемаз класса D в настоящее время отсутствует, при этом фенотипическим маркером продукции ОХА-48 может служить высокий уровень резистентности к темоциллину (МПК > 128 мг/л или диаметр зоны задержки роста вокруг диска с темоциллином < 11 мм [нагрузка – 30 мкг/диск]). Для дифференциации продукции карбапенемаз и гиперпродукции AmpC в сочетании с потерей поринов в состав тестов включается клоксациллин, являющийся ингибитором AmpC бета-лактамаз.

Следует заметить, что при сочетанной продукции одним изолятом различных карбапенемаз синергизм с ингибиторами может не проявляться, что требует использования молекулярных методов диагностики. Подробно метод и порядок его реализации на практике описан в соответствующем руководстве EUCAST [11].

Метод комбинированных дисков прост в применении и характеризуется низкой стоимостью. В настоящее время доступны коммерческие наборы дисков с соответствующими ингибиторами для его постановки. Вместе с тем данный метод требует не менее 16–18 ч. для реализации и в ряде случаев не обеспечивает достаточного уровня специфичности получаемого результата, особенно при одновременной продукции нескольких

карбапенемаз. С его помощью невозможно дифференцировать молекулярный тип МБЛ. По-видимому, применение метода комбинированных дисков следует рассматривать преимущественно как вынужденную меру при недоступности молекулярных методов.

Метод инактивации карбапенемов

Метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method, CIM) – простой и доступный аналитический тест, позволяющий установить факт продукции карбапенемаз без их дифференциации у энтеробактерий и *P. aeruginosa*. Впервые данный тест был описан van der Zwaluw и соавт. в 2015 г. [12]. Принцип метода заключается в определении ферментативного гидролиза меропенема при инкубации стандартного диска с данным препаратом (нагрузка диска – 10 мкг меропенема) в водной суспензии тестируемого микроорганизма. При последующем помещении этого диска на поверхность агара Мюллера – Хинтона, инокулированного стандартным штаммом *Escherichia coli* ATCC 25922, чувствительным к карбапенемам, и инкубации в стандартных условиях, в случае продукции карбапенемаз тестируемым штаммом зона задержки роста стандартного штамма вокруг диска будет отсутствовать, так как меропенем был полностью разрушен. В противном случае (карбапенемазы отсутствуют) оставшийся в диске меропенем вызовет подавление роста стандартного штамма (Рисунок 1).

Тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью, может быть рекомендован к широкому применению, однако, как и метод комбинированных дисков, сопряжен с существенными затратами времени: для получения результата при его постановке суммарно требуется около суток. С целью экономии времени при высоком уровне устойчивости энтеробактерий, ассоциированном с продукцией карбапенемаз, данный метод можно использовать параллельно с определением чувствительности клинических штаммов к антибиотикам, так как его стоимость и трудоемкость невелика.

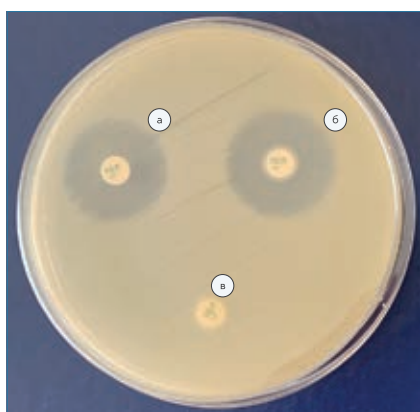


Рисунок 1. Метод инактивации карбапенемов

а – контроль; б – изолят *K. pneumoniae*, не продуцирующий карбапенемазы; в – изолят *K. pneumoniae*, продуцирующий карбапенемазы.

Существует модифицированный метод инактивации карбапенемов (Modified Carbapenem Inactivation Method, mCIM), когда при приготовлении суспензии тестируемого изолята дистиллированную воду заменяют на триптиказо-соевый бульон (ТСБ), а также пролонгируют время инкубации диска с меропенемом в данной суспензии с 2 до 4 ч. Данная модификация продемонстрировала несколько большую чувствительность – 93% по сравнению с 82% у исходного метода [13]. Известен также дополнительный прием, реализуемый параллельно с mCIM, позволяющий дифференцировать сериновые бета-лактамазы и МБЛ – EDTA Modified Carbapenem Inactivation Method (eCIM). Его постановка аналогична mCIM, за исключением добавления ЭДТА (ингибитора МБЛ) в суспензию тестируемого изолята, в которую помещают диск с меропенемом. После суточной инкубации считывают результат mCIM. Если он является положительным, то сравнивают диаметры зон задержки роста контрольного штамма вокруг дисков с меропенемом, использованных для постановки mCIM и eCIM. В случае если диаметр зоны задержки роста в eCIM превышает на ≥ 5 мм таковой в mCIM, то тестируемый штамм признают продуцентом МБЛ [14].

Carba NP тест

Carba NP представляет собой колориметрический тест, используемый для обнаружения продукции карбапенемаз энтеробактериями, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. без возможности их дифференциации. Название теста происходит от инициалов его авторов – Patrice Nordmann и Laurent Poirel, описавших свою разработку в 2012 г. [15]. Тест основан на визуальной регистрации изменения цвета индикатора pH среды (фенолового красного), происходящего в результате гидролиза имипенема в присутствии продуцента карбапенемаз, приводящего к закислению реакционной смеси (Рисунок 2).

Существуют коммерческие тест-системы для постановки Carba NP теста (не зарегистрированы для ме-



Рисунок 2. Carba NP тест

а – изолят *K. pneumoniae*, продуцирующий карбапенемазы NDM + OXA48; б – контроль.

дицинского применения на территории РФ), также его достаточно легко реализовать в лаборатории с использованием распространенных и недорогих реагентов и материалов. Прописи приготовления рабочих растворов реактивов, а также методика постановки теста подробно изложена в руководстве CLSI [16].

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о возможно недостаточной чувствительности Carba NP теста в отношении продуцентов карбапенемаз молекулярного типа ОХА, а также у мукоидных штаммов.

Существуют модификации теста, в частности с заменой индикатора фенолового красного на бромкрезоловый пурпурный, а также его адаптации для определения продукции карбапенемаз у *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. Интерес также представляет разработка, реализующая Carba NP тест на бумажных полосках [17].

Важным преимуществом Carba NP теста, помимо высокой чувствительности и специфичности (> 90%), низкой стоимости и простоты реализации, является скорость получения результата – менее 2 ч., при этом ферменты с более выраженной гидролитической активностью (КРС, МБЛ) могут вызывать изменение цвета индикатора уже через 20–30 мин. от начала тестирования.

Иммунохроматографические латеральные тесты

Одной из весьма перспективных современных разработок для определения продукции карбапенемаз являются иммунохроматографические латеральные тесты. Они отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, скоростью получения результата (около 15 мин.) и, что весьма важно, возможностью определения типа фермента. Тесты основаны на использовании меченных коллоидным золотом моноклональных антител к соответствующим эпитопам выявляемых антигенов (в данном случае – карбапенемаз) [18]. Экстракт тестируемой культуры микроорганизма при внесении в специальную лунку теста соединяется со смесью меченных коллоидным золотом моноклональных антител к различным карбапенемазам. При наличии карбапенемаз происходит их конъюгация с соответствующими антителами, далее смесь за счет капиллярных сил движется в толще нитроцеллюлозной подложки, на которую нанесены раздельно в виде полосок моноклональные антитела к каждому из определяемых ферментов. Если в смеси имеются конъюгаты или конъюгаты карбапенемаз, то они фиксируются в области соответствующих зон, формируя за счет коллоидного золота окрашенную в бордовый цвет полоску (Рисунок 3). В отсутствие карбапенемаз окрашивается только контрольная полоска, что подтверждает пригодность тест-системы и правильность выполнения анализа.

Данные тест-системы по своей специфичности практически не уступают молекулярным методам, при этом они не требуют аппаратного обеспечения и заметно выигрывают по времени получения результата. Существуют разработки как для детекции одного вида ферментов (в частности КРС, ОХА-23), так и для наиболее востребованного в настоящее время на практике комплекса (КРС, ОХА-48, VIM, IMP, NDM). Помимо культуры микроорганизмов, в литературе описан успеш-

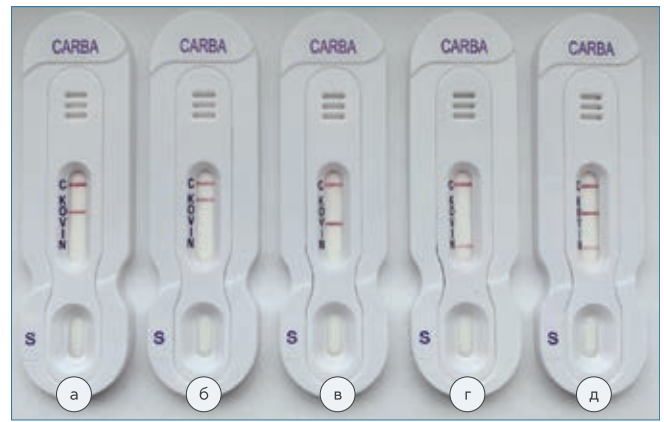


Рисунок 3. Иммунохроматографические тесты для определения продукции и молекулярного типа карбапенемаз

а – *K. pneumoniae* ОХА-48; б – *K. pneumoniae* КРС; в – *P. aeruginosa* VIM; г – *E. coli* NDM; д – *K. pneumoniae* ОХА-48 + NDM.

ный опыт использования в качестве субстрата и других образцов (например, содержимого положительного флакона при посеве крови, материала из ректальных мазков) [19]. В настоящее время иммунохроматографические латеральные тесты для детекции карбапенемаз выпускаются рядом зарубежных производителей, но ни один из них пока не зарегистрирован в РФ для медицинского применения.

MALDI-TOF масс-спектрометрия

Матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) в последние годы все шире применяется для идентификации микроорганизмов путем анализа молекулярного спектра константных белков. Данный метод также позволяет косвенно оценивать устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, если она обусловлена гидролитическими механизмами, по выявлению продуктов гидролиза соответствующего препарата. В общем случае применительно к определению продукции карбапенемаз суспензию тестируемого микроорганизма инкубируют в присутствии меропенема или эртапенема (как более стойких к спонтанному гидролизу) в течение нескольких часов, после чего выполняют исследование методом MALDI-TOF MS. Появление специфических пиков продуктов деградации карбапенема расценивается как следствие активности карбапенемаз [20]. Существенный интерес также представляет собой возможность определения методом MALDI-TOF MS плазмидных белков, ассоциированных с продукцией карбапенемаз. Известно описание применения такого подхода для обнаружения плазмиды rKpQII, кодирующей карбапенемазу КРС в изолятах карбапенеморезистентных энтеробактерий [21].

В целом, по данным литературы, использование метода MALDI-TOF MS для определения продукции карбапенемаз характеризуется вариабельной чувствительностью и специфичностью, особенно в случае присутствия умеренно активных ферментов (в частности типа

ОХА-48). Кроме того, его применение сопряжено с необходимостью наличия соответствующего дорогостоящего оборудования с программным обеспечением, отличным от используемого при рутинной идентификации микроорганизмов, а также обученного персонала.

Молекулярные методы детекции генов карбапенемаз

В настоящее время молекулярные методы являются «золотым стандартом» обнаружения продуцентов карбапенемаз. Данные методы включают в себя ПЦР, метод микрочипов и полногеномное секвенирование. Помимо собственно детекции генов карбапенемаз, молекулярные методы могут использоваться для верификации результатов, полученных фенотипическими и аналитическими методами.

Большинство используемых на практике молекулярных методов определения устойчивости к карбапенемам базируется на технологии ПЦР. Эти методы основаны на амплификации целевых последовательностей ДНК микроорганизма с детекцией продуктов амплификации (наиболее удобно для практики – в реальном времени) и могут быть выполнены с использованием в качестве субстрата как колоний микроорганизмов, так и непосредственно клинических образцов, что существенно ускоряет получение результата. Использование микрочипов позволяет существенно повысить «мультиплексность» теста: если в одну постановку ПЦР в реальном времени возможно проведение анализа до 5–8 целевых последовательностей ДНК, что определяется конечным разнообразием флуоресцентных меток и каналностью детектора, то метод микрочипов позволяет анализировать сотни мишеней. В настоящее время разработан ряд коммерческих продуктов, реализующих данную технологию, которые позволяют идентифицировать микроорганизмы, а также определять молекулярные маркеры их антибиотикорезистентности, включая гены, кодирующие карбапенемазы. Метод полногеномного секвенирования является времязатратным и весьма дорогостоящим, поэтому в подавляющем большинстве случаев используется только в исследовательских целях.

Методы, основанные на ПЦР и технологии микрочипов, являются быстрыми и надежными для специфической детекции генов карбапенемаз. Тем не менее ряд из них требует специально оборудованных помещений и специально обученного персонала, а также характеризуется высокой стоимостью. Общим недостатком всех молекулярных методов является отсутствие возможности обнаружения новых типов карбапенемаз или новых их вариантов. Кроме того, молекулярные методы являются в известной степени непрямими, так как определяют наличие генов, но не оценивают их экспрессию. В связи с этим, несмотря на приближающуюся к абсолютной корреляцию наличия гена и продукции соответствующего фермента, может быть целесообразным параллельно с молекулярными методами применение аналитических методов для подтверждения продукции карбапенемаз.

Развитие современных технологий ПЦР в реальном времени привело к разработке удобных на практике си-

стем, не предъявляющих особых требований к помещению и квалификации оператора. Все этапы обработки образца могут происходить в одноразовом блоке, поэтому такие системы получили название «лаборатория в картридже» (Рисунок 4).

Наш опыт применения такой тест-системы, GeneXpert DX (Cepheid, США), применительно к детекции генетических маркеров резистентности к карбапенемам включает исследование 80 образцов клинического материала (отделяемое нижних дыхательных путей – 58, кровь – 12, другие образцы – 10). В качестве субстрата для ПЦР в режиме реального времени использовано 69 изолятов грамотрицательных бактерий, также исследовано содержимое 11 флаконов с положительной гемокультурой, вызванной грамотрицательными патогенами, без их предварительной идентификации. В 42/80 (52,5%) образцах выявлено наличие генов blaNDM + blaOXA-48 (n = 18, во всех случаях – у *Klebsiella pneumoniae*), blaOXA-48 (*K. pneumoniae*, n = 11; *Serratia marcescens*, n = 3), blaKPC (n = 7, во всех случаях – у *K. pneumoniae*) и blaNDM (n = 3, во всех случаях – у *E. coli*). Сравнение результатов с данными, полученными с помощью ПЦР-наборов MDR MBL-FL, MDR KPC/OXA-48-FL (АмплиСенс, Россия), показало их полное совпадение, при этом «лаборатория в картридже» не требовала пробоподготовки, занимала существенно меньше времени (менее 1 ч.) и являлась более удобной при небольшом количестве образцов. Результаты традиционных микробиологических методов во всех случаях также подтвердили полученные результаты с временной задержкой в 1–3 сут. [22].

В сентябре 2019 г. наборы реагентов для быстрой идентификации генов лекарственной устойчивости к кар-

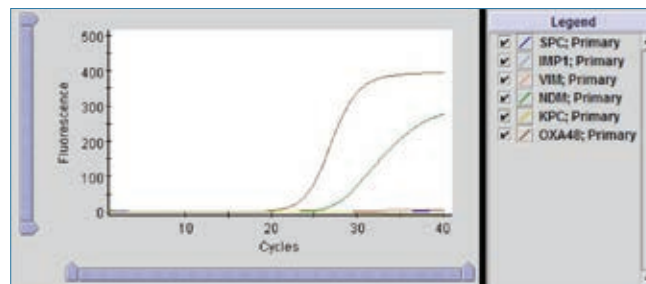


Рисунок 4. Система ПЦР в режиме реального времени GeneXpert DX (Cepheid, США) с примером результата исследования (*K. pneumoniae* OXA-48 + NDM)

бапенемам для системы GeneXpert были зарегистрированы и разрешены для медицинского применения в РФ.

Заключение

Разработка и практическое применение комплексных подходов, сдерживающих формирование и распространение устойчивости к антимикробным препаратам, является важнейшей задачей современности. С этой целью недавно была принята Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г., утвержденная распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р [23]. Стоит отметить, что одним из ключевых аспектов предупреждения и ограничения распространения резистентности является обеспечение быстрой и точной этиологической диагностики, которая, помимо традиционной идентификации патогена с определением его чувствительности к антибиотикам, в ряде случаев должна давать расшировку молекулярных механизмов антибиотикорезистентности. Особое значение при этом имеет определение продукции карбапенемаз устойчивыми к карбапенемам грамотрицательными бактериями и их типирование.

Учитывая выраженную тенденцию роста уровня резистентности к карбапенемам, при выполнении рутинных исследований биологического материала от больных с нозокомиальными инфекциями следует проявлять настороженность в отношении потенциальных продуцентов карбапенемаз. При выявлении зоны задержки роста исследуемого изолята меньше значения эпидемиологической точки отсечения и/или повышенных значений МПК (в обоих случаях рекомендовано ориентироваться по меропенему) следует проверить данный изолят на предмет продукции карбапенемаз одним из простых и доступных способов (например, методом инактивации карбапенемов или Carba NP тестом). Вне зависимости от его результата, если по действующим правилам интерпретации диаметра зоны задержки роста и/или МПК микроорганизм попадает в категорию «чувствительный», карбапенемы могут применяться для лечения данной инфекции, а информация о продукции карбапенемаз при этом используется преимущественно в целях инфекционного контроля [11]. Вместе с тем в случае тяжелых инфекций, инфекций «трудной» локализации и при использовании субоптимальных режимов дозирования карбапенемов возможна терапевтическая неудача. В случае фенотипической устойчивости к карбапенемам полученные данные необходимы для выбора соответствующих режимов терапии и нуждаются в расшировке подтверждающими методами. Так, например, при устойчивости энтеробактерий к карбапенемам, обусловленной продукцией сериновых карбапенемаз, даже при сочетанной продукции БЛРС высокой эффективностью обладает новый защищенный цефалоспорин – цефтазидим/авибактам; действенной также может оказаться тактика использования высоких доз карбапенемов. В случае продукции МБЛ, обладающих высокой гидролитической активностью и не ингибируемых авибактамом, а также при одновременной продукции нескольких карбапенемаз (наиболее частый вариант – OXA-48 + NDM)

необходимо применение альтернативных препаратов, в частности полимиксинов и комбинаций на их основе. Надежным режимом терапии при таком варианте также является применение комбинации цефтазидима/авибактама и азтреонама. Данная комбинация активна в отношении продуцентов БЛРС и карбапенемаз классов В, С и D. Азтреонам может быть использован как одна из терапевтических возможностей при инфекциях, вызванных штаммами *P. aeruginosa*, продуцирующими МБЛ.

В основе описанной выше логики выбора препарата лежит типирование карбапенемаз, для проведения которого наиболее удобно использование молекулярных методов. В случае отсутствия последних возможно использование метода комбинированных дисков.

В Таблице 1 приведена сравнительная характеристика рассмотренных выше методов определения продукции карбапенемаз.

Фенотипические методы просты и доступны, поэтому они являются весьма привлекательными для использования в рутинной практике, особенно при ограниченных материальных ресурсах лаборатории. Основной их недостаток – длительность получения результата. Однако с учетом низкой стоимости и трудоемкости постановки фенотипических тестов их можно проводить параллельно с определением чувствительности возбудителя к карбапенемам, что позволяет нивелировать проблему временной задержки.

Среди аналитических методов наибольший практический интерес представляют Carba NP тест и иммунохроматографические латеральные тесты. Carba NP тест прост и дешев в практической реализации и позволяет в течение нескольких часов определить продукцию карбапенемаз исследуемым изолятом, но не дает возможности определить тип фермента. Иммунохроматографическим латеральным тестам в настоящее время принадлежит «рекорд» скорости получения результата: время выполнения теста согласно инструкции одной из компаний-производителей составляет 15 мин., на практике результат визуализируется уже в первые минуты от начала тестирования. Данные тесты характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя определить тип карбапенемаз или их сочетаний. Наряду с непосредственным применением, с экономических позиций может быть оправдано их использование в качестве подтверждающих тестов при получении положительных результатов фенотипических методов или Carba NP теста.

Модифицированный тест Ходжа характеризуется недостаточной чувствительностью и специфичностью, особенно в отношении продуцентов МБЛ. Так, в одном из исследований с его помощью удалось выявить лишь 50% изолятов, продуцирующих NDM [24]. Кроме того, модифицированный тест Ходжа может давать ложноположительные результаты при тестировании штаммов, характеризующихся гиперпродукцией AmpC или БЛРС в сочетании с потерей пориновых каналов. Всё это обуславливает исключение данного теста из рекомендованных к практическому применению.

Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения продукции ферментов, гидролизующих карбапенемы, представляет в настоящее время скорее научный, чем практический интерес, что обусловлено

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов определения продукции карбапенемаз

Метод	Субстрат	Преимущества	Недостатки
Метод комбинированных дисков	Чистая культура	Легкость выполнения исследования, дешевизна, не требует специального оборудования; позволяет дифференцировать продуцентов ОХА-48, КРС и МБЛ	Длительность исследования (18–24 ч.); сложность интерпретации при сочетании механизмов резистентности
Метод инаktivации карбапенемов	Чистая культура	Легкость выполнения исследования, дешевизна, не требует специального оборудования	Длительность исследования (18–24 ч.); не позволяет дифференцировать тип карбапенемаз, однако возможно различить сериновые бета-лактамазы и МБЛ (eCIM)
Carba NP тест*	Чистая культура	Легкость выполнения исследования, дешевизна, быстрота получения результата, не требует специального оборудования	Не позволяет дифференцировать тип карбапенемаз; возможна недостаточная чувствительность в отношении ферментов с невысокой карбапенемазной активностью (в частности ОХА-48) и мукоидных изолятов
Иммунохроматографические латеральные тесты*	Чистая культура, материал, получаемый в ходе бактериологического исследования (например, содержимое положительного флакона с гемокультурой)	Легкость выполнения исследования, быстрота получения результата	Отсутствие возможности выявления новых вариантов карбапенемаз
MALDI-TOF MS	Чистая культура	Быстрота получения результата	Необходимость наличия специального оборудования с адаптированным программным обеспечением и обученного персонала; недостаточно валидирован; не позволяет дифференцировать тип карбапенемаз; высокая стоимость оборудования
Молекулярно-генетические методы	Чистая культура, материал, получаемый в ходе бактериологического исследования (например, содержимое положительного флакона с гемокультурой), нативный материал	Быстрота получения результата	Необходимость наличия специального оборудования и обученного персонала; отсутствие возможности выявления новых вариантов карбапенемаз; сравнительно высокая стоимость оборудования и в ряде случаев расходных материалов

* Коммерческий тест в настоящее время не зарегистрирован в РФ.

относительной сложностью методики и отсутствием явных преимуществ по сравнению с более простыми тестами.

Молекулярные методы на современном этапе являются наиболее перспективными, поскольку позволяют быстро, с практически абсолютной чувствительностью и специфичностью определить наличие генов, кодирующих карбапенемазы. Важным преимуществом молекулярных методов является возможность прямого исследования клинических образцов без выделения чистой культуры микроорганизмов. Следует учитывать, что с помощью данных методов невозможно обнаружить не идентифицированные ранее гены устойчивости, а в случае сниженной экспрессии гена его наличие может не полностью коррелировать со значимой продукцией соответствующего фермента, поэтому молекулярные методы целесообразно выполнять как второй этап после выявления продукции карбапенемаз фенотипическими

или аналитическими методами, что также оправдано и с экономических позиций.

Возможный клинический алгоритм выявления продукции карбапенемаз представлен на Рисунке 5. Выбор оптимального метода, помимо аналитических характеристик, определяется целями его применения (скрининг или диагностика), используемым субстратом (бактериальная культура или нативный материал), приемлемым сроком получения результата, а также простотой, доступностью и стоимостью. Единого мнения в вопросе «идеального» метода определения продукции карбапенемаз в настоящее время нет.

Конфликт интересов

Статья подготовлена при финансовой поддержке компании Pfizer. В статье выражена позиция автора, которая может отличаться от позиции компании Pfizer.



* Использование карбапенемов в стандартных дозах в виде монотерапии может быть недостаточно эффективным, особенно в случае тяжелых инфекций.

** При выявлении генов blaKPC, blaOXA-48 – цефтазидим/авибактам или комбинации на основе полимиксинов. При выявлении генов МБЛ – комбинации на основе полимиксинов или цефтазидим/авибактам + азтреонам.

Литература

- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., and the "MARATHON" study group. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacteriaceae isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON" 2013-2014. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19;1:49-56. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19;1:49-56.)
- Edelstein M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Shek E.A., Dekhnic A.V., Azizov I.S., Kozlov R.S. and the "MARATHON" study group. Antimicrobial resistance of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON" 2013-2014. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19;1:37-41. Russian. (Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Азизов И.С., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19;1:37-41.)
- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shek E.A., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., and the "MARATHON" study group. Antimicrobial resistance of nosocomial *Acinetobacter* spp. isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON" 2013-2014. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19;1:42-48. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19;1:42-48.)
- Ye Y., Xu L., Han Y., et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. *Exp Ther Med*. 2018;15(1):1143-1149. DOI: 10.3892/etm.2017.5485
- Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*. 2013;19(4):549-559. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7
- Rello J., Kalwaje Eshwara V., Lagunes L., et al. A global priority list of the Top TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(2):319-323. DOI: 10.1007/s10096-018-3428-y
- Kozlov R.S., Stetsiouk O.U., Andreeva I.V. Ceftazidime-avibactam: new rules for the game against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2018;1:24-34. Russian. (Козлов

- Р.С., Стецюк О.У., Андреева И.В. Цефтазидим-авибактам: новые «правила игры» против полирезистентных грамотрицательных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;1:24-34.
8. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15-21. DOI: 10.1177/2049936115621709
 9. Lazareva I.V., Ageev V.A., Ershova T.A., et al. Prevalence and Antibiotic Resistance of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Saint Petersburg and Some Other Regions of the Russian Federation. *Antibiotiki i himioterapija*. 2016;11-12:28-38. Russian. (Лазарева И.В., Агеев В.А., Ершова Т.А. и соавт. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016;11-12:28-38.)
 10. Kuzmenkov A.Yu, Trushin I.V, Avramenko A.A., et al. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19(2):84-90. Russian. (Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А. и соавт. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(2):84-90.)
 11. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.0. Available at: www.eucast.org/resistance_mechanisms.
 12. van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in GramNegative Rods. *PLoS One*. 2015;10(3):e0123690. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690
 13. Pierce V.M., Simner P.J., Lonsway D.R., et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2321-2333. DOI: 10.1128/jcm.00193-17
 14. Sfeir M.M., Hayden J.A., Fauntleroy K.A., et al. EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2019;57(5). DOI: 10.1128/JCM.01757-18
 15. Nordmann P., Poirel L., Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(9):1503-1507. DOI: 10.3201/eid1809.120355
 16. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
 17. Srisrattakarn A., Lulitanond A., Wilailuckana C., et al. Modification and evaluation of the Carba NP test by use of paper strip for simple and rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(7):117. DOI: 10.1007/s11274-016-2064-x
 18. Greissl C., Saleh A., Hamprecht A. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in Enterobacterales by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(2):331-335. DOI: 10.1007/s10096-018-3432-2
 19. Wareham D.W., Phee L.M., Abdul Momin M. Direct detection of carbapenem resistance determinants in clinical specimens using immunochromatographic lateral flow devices. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1997-1998. DOI: 10.1093/jac/dky095
 20. Burckhardt I., Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3321-3324. DOI: 10.1128/jcm.00287-11
 21. Lau A.F., Wang H., Weingarten R.A., et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):2804-2812. DOI: 10.1128/jcm.00694-14
 22. Popov D.A. Experience of using real-time PCR for the detection of genetic markers of antibiotic resistance. Proceedings of the XXIII Annual Session "A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery" with the All-Russian Conference of Young Scientists, Moscow, May 19-21, 2019, p. 136. Russian. (Попов Д.А. Опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для детекции генетических маркеров антибиотикорезистентности. Сборник тезисов XXIII Ежегодной сессии «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» с Всероссийской конференцией молодых ученых, Москва, 19-21 мая 2019 г.), с. 136.
 23. Strategy to prevent the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030. Approved by order of the Government of the Russian Federation of September 25, 2017. № 2045-p. Available at: <http://government.ru/docs/29477>. Accessed June 15, 2019. Russian. (Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р. Доступно по адресу: <http://government.ru/docs/29477>. Ссылка активна на 15 июня 2019 г.)
 24. Girlich D., Poirel L., Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of 551 emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012;50:477-479. DOI: 10.1128/jcm.05247-11