



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение

Версия 2.0¹

Июль 2017 г.

¹На основе версии 1.0, принятой в декабре 2013 г. подкомитетом EUCAST по разработке методов выявления механизмов резистентности и резистентности, имеющей важное клиническое и/или эпидемиологическое значение.

Авторы оригинальной версии: Кристиан Г. Гиске (Christian G. Giske) (Швеция, председатель Руководящего комитета и Координационной группы EUCAST), Луис Мартинес-Мартинес (Luis Martinez-Martinez) (Испания), Рафаэль Кантон (Rafael Cantón) (Испания, EUCAST), Стефания Стефани (Stefania Stefani) (Италия), Роберт Скв (Robert Skov) (Германия), Юрий Глупшинский (Youri Glupczynski) (Бельгия), Патрис Нордман (Patrice Nordmann) (Франция), Мэнди Вуттон (Mandy Wootton) (Великобритания), Виви Мирьягу (Vivi Miriagou) (Греция), Гуннар Скв Симонсен (Gunnar Skov Simonsen) (Норвегия, член Координационной группы EARS-Net), Хелена Земликова (Helena Zemlickova) (Чехия, член Координационной группы EARS-Net), Джеймс Коэн-Стюарт (James Cohen-Stuart) (Нидерланды), Марек Гнядковски (Marek Gniadkowski) (Польша).

Содержание

Раздел	Страница
1. Введение	3
2. Энтеробактерии, продуцирующие карбапенемазы.....	5
3. Энтеробактерии, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (ESBL).....	17
4. Энтеробактерии, продуцирующие приобретенные AmpC β -лактамазы	29
5. Резистентность к полимиксинам у грамотрицательных бактерий	34
6. Продукция карбапенемаз у <i>P. aeruginosa</i> и <i>Acinetobacter</i>	37
7. Метициллинорезистентный <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	39
8. Резистентность к ванкомицину у <i>Staphylococcus aureus</i>	43
9. Устойчивость <i>Enterococcus faecium</i> и <i>Enterococcus faecalis</i> к ванкомицину	49
10. <i>Streptococcus pneumoniae</i> , нечувствительный к пенициллину (недиккий тип).....	55

1. Введение

Настоящий документ является обновленной версией рекомендаций подкомитета EUCAST по выявлению механизмов резистентности, подготовленной Руководящим комитетом EUCAST. Документ разработан, главным образом, для использования в повседневной практике клинических микробиологических лабораторий, и не содержит описания методов выявления механизмов устойчивости на молекулярном уровне для референтных или экспертных лабораторий. Вместе с тем, данные рекомендации в большей части могут использоваться национальными референтными лабораториями. Данный документ не содержит описания процедур выявления бессимптомного носительства (колонизации) полирезистентных микроорганизмов, а также их обнаружения непосредственно в клинических образцах.

Каждая глава документа содержит определение механизма устойчивости, описание необходимости его выявления с клинической и/или эпидемиологической точки зрения, краткое описание рекомендуемых методов выявления, а также ссылки на литературные источники, содержащие подробное описание данных методов. Степень необходимости и уровень точности определения механизма устойчивости, требуемый для работы органов здравоохранения или системы инфекционного контроля, могут различаться как в разных регионах, так и в разные периоды времени в зависимости от распространенности и разнообразия механизмов устойчивости. Документ был разработан путем выполнения литературного поиска; рекомендации, содержащиеся в нем, основаны на результатах многоцентровых исследований или исследований, выполненных более чем одним центром. Описание некоторых методов, находящихся в настоящее время на стадии разработки, многоцентровые **или множественные одноцентровые** исследования которых еще не завершены, не было включено в руководство. Предварительные версии данного документа были предметом широкого обсуждения экспертами EUCAST, посредством веб-сайта EUCAST, а также специалистами, включенными в состав координационных центров Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (ECDC).

Несмотря на то, что мы, по возможности, пытались пользоваться генерическими названиями представленных в данном руководстве продуктов, полное исключение их конкретных названий привело бы к неясности некоторых рекомендаций. Следует отметить, что наличие некоторых механизмов устойчивости у изолята не всегда автоматически предполагает его клиническую

устойчивость. Это может быть связано с отсутствием экспрессии механизма или экспрессией низкого уровня, который не приводит к фенотипическому проявлению резистентности. Поэтому выявление некоторых механизмов может иметь эпидемиологическое значение, но не является обязательным для клинических целей. Следовательно, само по себе выявление некоторых механизмов, в частности β -лактамаз расширенного спектра и карбапенемаз у грамотрицательных бактерий, не означает их классификации, как клинически устойчивых.

Кристиан Г. Гиске (Christian G. Giske)

Президент EUCAST, вице-президент подкомитета по выявлению механизмов резистентности

2. Энтеробактерии, продуцирующие карбапенемазы

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Нет
С целью инфекционного контроля	Да
Для целей общественного здравоохранения	Да

2.1 Определение

Карбапенемазы – это β -лактамазы, гидролизующие пенициллины, большинство цефалоспоринов и в различной степени карбапенемы и монобактамы (последние не гидролизуются металло- β -лактамазами).

2.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение выявления механизмов устойчивости

Проблема распространения карбапенемаз в Европе возникла во второй половине 1990-х годов в нескольких странах Средиземноморского региона, в основном – у *P. aeruginosa* (1). В начале 2000-х годов в Греции наблюдалось эпидемическое распространение интегронокодируемой металло- β -лактамазы (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase - VIM) среди штаммов *K. pneumoniae* (2), а затем – карбапенемазы эпидемически, связанной со штаммами *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC) (1). В настоящее время в Европе наиболее быстро увеличивающейся группой карбапенемаз являются OXA-48-подобные карбапенемазы (3). В Греции и Италии около 62 и 33% (соответственно) всех инвазивных изолятов *K. pneumoniae*, являются нечувствительными к карбапенемам (4). В 2015 году межрегиональное или эндемичное распространение **карбапенемазопродуцирующих энтеробактерий (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE)** было зарегистрировано в 13/38 странах по сравнению с 6/38 в 2013 г. Только в 3 странах не было зарегистрировано ни одного случая выявления CPE (3). Другими карбапенемазами, представляющими собой серьезную проблему, является Нью-Дели металло- β -лактамазы (New Delhi metallo- β -lactamase, NDM), широко распространенные на индийском субконтиненте и Ближнем Востоке, которые были занесены и в Европу (3), и в некоторых странах также получили региональное распространение (5). **Кроме того, в некоторых регионах мира часто встречаются карбапенемазы группы IMP (6).**

Карбапенемазы могут приводить к устойчивости практически ко всем β -лактамам и быстро распространяться и поэтому являются предметом особого беспокойства. Кроме того, карбапенемазопродуцирующие штаммы часто обладают механизмами устойчивости к широкому спектру антимикробных препаратов, а инфекции, вызываемые карбапенемазопродуцирующими энтеробактериями, характеризуются высоким уровнем летальности (7-9).

2.3 Механизмы устойчивости

подавляющее большинство карбапенемаз являются приобретенными ферментами, которые кодируются генами, входящими в состав мобильных генетических элементов, расположенных на плазмидах. Карбапенемазы характеризуются различным уровнем экспрессии и существенно отличаются как по своим биохимическим характеристикам, так и по активности в отношении тех или иных β -лактамов. Уровень экспрессии и свойства β -лактамазы и частота ассоциации с другими механизмами устойчивости (другими β -лактамазами, активным выведением антибиотика из клетки (эффлюксом) и/или нарушением проницаемости) приводят к формированию широкого диапазона фенотипов резистентности, наблюдаемых у карбапенемазопродуцирующих изолятов (10, 11). Кроме того, снижение чувствительности энтеробактерий к карбапенемам может быть вызвано сочетанием продукции β -лактамаз расширенного спектра (ESBL) или AmpC-ферментов со снижением проницаемости в результате повреждения или снижения регуляции экспрессии поринов (12), и, возможно, также пенициллинсвязывающих белков (13).

Карбапенемазопродуцирующие энтеробактерии (CPE) обычно характеризуются пониженной чувствительностью к карбапенемам и в большинстве случаев устойчивы к цефалоспоринам расширенного спектра (оксиименоцефалоспоринам, таким как цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим и/или цефепим) (14). Продуценты некоторых карбапенемаз (например, OXA-48-подобных), могут быть полностью чувствительны к цефалоспоринам. Однако в настоящее время большинство карбапенемазопродуцирующих изолятов являются также и ко-продуцентами ферментов, гидролизующих цефалоспорины, таких как ESBL CTX-M-типа, и поэтому характеризуются устойчивостью и к цефалоспоринам. Продукция карбапенемаз имеет большое эпидемиологическое значение, особенно в тех случаях, когда это приводит к пониженному уровню чувствительности к карбапенемам (имипенему,

меропенему, эртапенему или дорипенему), то есть к увеличению МПК выше эпидемиологических точек отсечения (ECOFF), установленных EUCAST (15).

2.4 Рекомендуемые методы выявления карбапенемаз у энтеробактерий

2.4.1 Скрининговые методы выявления карбапенемаз

Значения МПК энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, могут быть ниже установленных пограничных значений клинической резистентности (14-16). Для выявления продуцентов карбапенемаз могут быть использованы значения ECOFF, установленные EUCAST. Оптимальным соотношением чувствительности и специфичности для выявления продукции карбапенемаз обладает меропенем (14, 17). Эртапенем обладает наиболее высокой чувствительностью, но низкой специфичностью, особенно у таких бактерий, как *Enterobacter* spp. в связи с его относительно небольшой нестабильностью к действию β-лактамаз расширенного спектра (ESBL) и AmpC β-лактамаз в комбинации с потерей поринов (14). Пороговые значения МПК и диаметров зон подавления роста для выявления предполагаемых продуцентов карбапенемаз приведены в таблице 1. Следует отметить, что для повышения специфичности скрининговые пороговые значения для имипенема и эртапенема были установлены на одно разведение выше, чем соответствующие значения ECOFF.

Таблица 1. Клинические пограничные значения и скрининговые пороговые значения для выявления карбапенемазопродуцирующих энтеробактерий (по методологии EUCAST).

Карбапенем	МПК (мг/л)		Диаметр зоны подавления роста (мм), 10 мкг/диск	
	Пограничное значение Ч/УР	Пороговое значение для скрининга	Пограничное значение Ч/УР	Пороговое значение для скрининга
Меропенем ¹	≤2	>0,125	≥22	<28 ²
Эртапенем ³	≤0,5	>0,125	≥25	<25

¹Оптимальный баланс чувствительности и специфичности

²Если зона подавления роста находится в пределах 25-27 мм поиск продукции карбапенемаз необходимо проводить только в случае резистентности изолята к пиперациллину-тазобактаму и/или темоциллину (темоциллин обладает большей специфичностью). Выявление карбапенемаз должно проводиться во всех случаях, если диаметр зоны <25 мм.

³Высокая чувствительность, но низкая специфичность. Можно использовать в качестве альтернативного препарата для скрининга, но изоляты, обладающие ESBL и AmpC, могут проявлять устойчивость и в отсутствии карбапенемаз.

После обнаружения пониженной чувствительности к карбапенемам при определении чувствительности стандартными методами необходимо воспользоваться фенотипическими методами выявления карбапенемаз.

Основными группами методов являются: методы комбинированных дисков, колориметрический анализ гидролиза карбапенемов, другие методы выявления гидролиза карбапенемов и иммунохроматографическое исследование. Некоторые из них описаны далее.

2.4.2 Метод комбинированных дисков

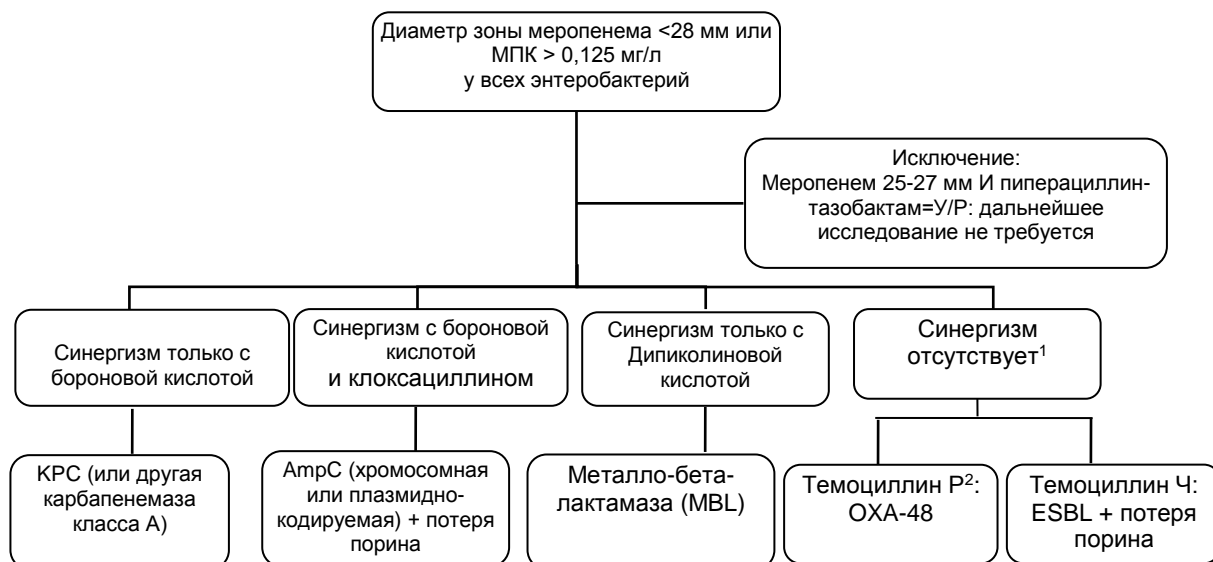
Метод комбинированных дисков стал первым доступным фенотипическим тестом. Коммерческие наборы для выполнения метода выпускают несколько производителей (компания MAST, Великобритания; Rosco, Дания) (18-20). В состав наборов входят диски или таблетки, содержащие меропенем и комбинации меропенема с различными ингибиторами: бороновая кислота – ингибитор карбапенемаз класса А (преимущественно КРС, для других – данные недостаточны), дипиколиновая кислота и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), ингибирующие карбапенемазы класса В. Кроме выше перечисленного, авибактам ингибирует ферменты группы ОХА-48, который, до сих пор пока не включен в наборы для фенотипического выявления (21, 22). В настоящее время ингибитор карбапенемаз класса D отсутствует. Для дифференциации продукции карбапенемаз и гиперпродукции AmpC в сочетании с потерей поринов в состав наборов включается клоксациллин, являющийся ингибитором AmpC β-лактамаз. Детальное описание ингибиторов приведено в разделе 2.4.3. Алгоритм интерпретации результатов исследования с использованием этих ингибиторов представлен на рисунке 1 и в таблице 2. Главным недостатком описанных методов является продолжительность исследования, которая составляет 18 часов (на практике – инкубация в течение ночи), что послужило причиной поиска новых быстрых методов выявления карбапенемаз.

В таблице 2 представлен алгоритм дифференциации между металло-β-лактамазами, карбапенемазами класса А, класса D и резистентностью к карбапенемам, не связанной с продукцией карбапенемаз (ESBL и/или AmpC в комбинации с потерей порина). При использовании коммерческих тестов необходимо следовать инструкции производителя.

В настоящее время доступных ингибиторов ОХА-48-подобных ферментов нет. В качестве фенотипического признака предположительной продукции ОХА-48-подобных карбапенемаз было предложено использовать устойчивость высокого уровня к темоциллину (МПК >128 мг/л) (23, 24). Однако это свойство не является специфичным только для карбапенемаз группы ОХА-48, такой фенотип может формироваться и при наличии других механизмов

резистентности. Поэтому наличие ОХА-48-подобных ферментов должно быть подтверждено другими методами.

Рисунок 1. Алгоритм выявления карбапенемаз.



¹ Сочетанная продукция нескольких карбапенемаз, например, MBL и KPC у одного изолята может быть причиной отсутствия синергизма. В таких случаях необходимо применение молекулярных методов.

² Фенотипический признак продукции ОХА-48-подобных карбапенемаз –резистентность высокого уровня к темоциллину (128 мг/л, диаметр зоны <11 мм).

Использование модифицированного теста клеверного листа (Ходжа) в настоящее время не рекомендуется из-за трудности интерпретации, низкой специфичности и, в отдельных случаях, недостаточной чувствительности (12). Описано несколько новых модификаций этого метода, но они достаточно трудоемки для использования в повседневной практике клинической микробиологической лаборатории и не решают всех проблем недостаточной чувствительности и специфичности.

Таблица 2. Интерпретация результатов фенотипического выявления карбапенемаз (названия карбапенемаз выделены **жирным шрифтом**) диско-диффузионным методом с использованием дисков или таблеток. Точные значения, свидетельствующие о наличии синергизма для различных коммерческих продуктов, указываются в инструкциях производителя.

β-лактамаза	Синергизм наблюдается при увеличении диаметра зоны (мм) вокруг диска/таблетки с меропенемом, 10 мкг				Темоциллин МПК >128 мг/л или диаметр зоны <11 мм
	ДПК/ЭДТА	АФБК /ФБК	ДПК АФБК +	КСЦ	
МБЛ	+	-	-	-	Переменная величина ¹
КРС	-	+	-	-	Переменная величина ¹
МБЛ + КРС²	Переменная величина	Переменная величина	+	-	Переменная величина ¹
ОХА-48-подобные	-	-	-	-	Да
АmpC + потеря порина	-	+	-	+	Переменная величина ¹
ESBL + потеря порин	-	-	-	-	Нет

Сокращения: МБЛ = металло-β-лактамаза, КРС = карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae*, ДПК = дипиколиновая кислота, ЭДТА = этилендиаминтетрауксусная кислота, АФБК = аминоксифенилбороновая кислота, ФБК = фенилбороновая кислота, КСЦ = клоксациллин.

¹ Определение чувствительности к темоциллину рекомендуется только в случае отсутствия синергизма при исследовании для дифференциации ESBL + потери поринов и продукции ОХА-48-подобных карбапенемаз (23, 24). При наличии других ферментов чувствительность к темоциллину является вариабельной и не может четко указывать на присутствие β-лактамаз.

² Указание на эффективность использования коммерческих таблеток, содержащих два ингибитора (ДПК или ЭДТА плюс АФБК или ФБК), (25) имеется только в одном докладе, однако многоцентровые исследования или множественные одноцентровые исследования эффективности данного метода отсутствуют. Эта комбинация приводит к резистентности высокого уровня к карбапенемам и за пределами Греции наблюдается редко.

2.4.3 Биохимические (колориметрические) тесты

Carba-NP тест – быстрый (<2 ч) тест для выявления гидролиза карбапенема, Гидролиз карбапенема приводит к изменению рН среды, что проявляется изменением цвета раствора, в который добавлен индикатор феноловый красный, с красного на желтый (26, 27). Валидация Carba-NP теста была проведена для бактерий, выросших на чашках с агаром Мюллера-Хинтон, кровяным, триптиказо-соевым агаром, а также на большинстве селективных сред, применяемых для скрининга продуцентов карбапенемаз. Carba-NP тест не следует выполнять с колониями бактерий, выросших на агаре Дригальского или МакКонки. Для получения воспроизводимых результатов необходимо тщательно выполнять рекомендации по выполнению теста на всех этапах.

Высокая чувствительность и специфичность метода продемонстрирована в нескольких публикациях (28). В то же время результаты одного исследования свидетельствуют о недостаточной чувствительности метода при работе с изолятами, имеющими мукоидный фенотип и некоторыми энтеробактериями, продуцирующими ОХА-48 (29). Показаны хорошие результаты выявления карбапенемаз у энтеробактерий с помощью коммерческого варианта Carba-NP теста (30, 31). Описаны трудности, встречающиеся при интерпретации результатов при использовании некоторых коммерческих наборов, включая коммерческий вариант Carba-NP теста, в частности при визуальном учете изменения окраски, а также не интерпретируемые результаты – в 3-5% случаев. Модификация Carba-NP теста – Blue-Carba тест (BCT) – биохимический тест для быстрого (<2 ч) выявления карбапенемазной активности (32, 33). В основе лежит гидролиз имипенема *in vitro* исследуемыми бактериями (при прямой инокуляции без предварительного лизиса), который выявляется по изменению рН среды с помощью индикатора бромтимолового синего (изменение окраски с синего на зеленый/желтый или с зеленого на желтый). При проведении масштабных исследований, выполненных Pasteran et al. (34), но в одной лаборатории, была показана высокая чувствительность метода для ферментов класса А и В и субоптимальная чувствительность для выявления ферментов группы ОХА-48.

Третий биохимический тест, который может быть выполнен в течение <2 ч, – β -CARBA тест™. Одна-три колонии исследуемой культуры перемешиваются с реагентом; учет результатов проводится максимум после 30 мин инкубации. Изменение окраски с желтого на оранжевый, красный или фиолетовый свидетельствует о положительном результате. В одном исследовании было показано, что 30-минутный период инкубации, рекомендуемый производителем, является недостаточным для выявления продукции ОХА-48 карбапенемаз. Коллекция штаммов, с помощью которой проводились оценочные исследования, была небольшой и для сравнения метода с другими биохимическими тестами требуются дальнейшие исследования (35). Другая работа показала отличные результаты β -CARBA теста™ по выявлению карбапенемазопродуцирующих энтеробактерий (CPE), и особенно продуцентов ОХА-48. В то же время наблюдались ложноположительные результаты теста в случае продукции других β -лактамаз, в частности гиперпродукции β -лактамазы K-1 у *Klebsiella oxytoca*, поэтому необходима дальнейшая оценка способности метода по выявлению других карбапенемаз класса А (33).

2.4.4 Метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method – CIM)

Принцип метода – выявление ферментативного гидролиза путем инкубации бактериальной суспензии в присутствии карбапенема. При проведении CIM-теста в качестве источника субстрата используются диски с антибиотиками для определения чувствительности. После инкубации полной петли бактериальной культуры в присутствии диска с меропенемом в течение 2 часов, диск помещается на поверхность агара, инокулированную суспензией контрольного штамма *Escherichia coli* ATCC 25922. Признаком ферментативной инактивации карбапенема является отсутствие зоны подавления роста вокруг диска; формирование зоны подавления роста свидетельствует об отсутствии карбапенемазной активности в результате подавляющего действия негидролизованного меропенема. Несмотря на различные результаты оценки эффективности CIM-теста (36-38) и до настоящего времени неясную прогностическую ценность отрицательного результата, этот метод является возможным альтернативным методом выявления карбапенемазной активности. Главным ограничением метода является продолжительность исследования, составляющая минимум 18 часов.

2.4.5 Выявление гидролиза карбапенемов с помощью MALDI-TOF

Принцип метода – выявление снижения амплитуды или исчезновения пиков, характерных для карбапенемов, в масс-спектре бактериальной суспензии, предварительно инкубированной в присутствии карбапенема, с помощью масс-спектрометра (MALDI-TOF) (39, 40). Измерение спектров проводится после высушивания между m/z 160 и 600 с помощью масс-спектрометра Microflex LT (39). В нескольких исследованиях была показана высокая чувствительность и специфичность данного метода, за исключением выявления ферментов группы ОХА-48. Вероятность выявления ОХА-48 увеличивается при добавлении в реакционную смесь гидрокарбоната аммония (NH_4HCO_3), что было продемонстрировано в исследовании Papagiannitsis CS et al (41). До настоящего времени оценка этого нового метода в многоцентровых исследованиях или множественных одноцентровых исследованиях не проведена. Кроме того, еще одной труднореализуемой на практике особенностью является необходимость изменения параметров работы MALDI-TOF, используемых для видовой идентификации микроорганизмов.

Иммунохроматографический анализ

Недавно был описан новый иммунохроматографический тест, основанный на иммунологическом связывании антигенной детерминанты ОХА-48, с использованием наночастиц коллоидного золота, связанных с нитроцеллюлозной мембраной, находящейся внутри тест-панели. Принцип метода основан на использовании моноклональных анти-ОХА-48 антител в качестве специфического реагента для связывания для прямой идентификации ферментов группы ОХА-48. Исследование выполняется в течение 4 минут. Выполнение теста оценивалось как с использованием колоний, так и содержимого флаконов для гемокультивирования (43-46). Недавно разработан подобный тест для выявления КРС, но оценка его эффективности в рамках многоцентровых или множественных одноцентровых исследований еще не проведена (46).

2.4.5 Контрольные штаммы

Перечень возможных контрольных штаммов, рекомендованных для проведения контроля качества фенотипических и генотипических методов выявления карбапенемаз, приведен в таблице 3. Диапазоны допустимых значений для этих контрольных штаммов не существуют. При использовании коммерческих систем следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 3. Контрольные штаммы для проведения контроля качества методов выявления карбапенемаз.

Штамм	Механизм
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC в сочетании со сниженной экспрессией поринов
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58547 или <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	Металло-β-лактамаза (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	Металло-β-лактамаза (NDM-1)
<i>E. coli</i> NCTC 13476	Металло-β-лактамаза (IMP)
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 56233 или <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	Карбапенемаза <i>Klebsiella pneumoniae</i> (КРС)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	Карбапенемаза ОХА-48
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	Отрицательный контроль

2.5 Литература

1. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18:413-31.
2. Vatopoulos A. High rates of metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. Euro Surveill. 2008;13(4). doi:pji: 8023.
3. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill. 2015;20(45).

4. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
5. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-2014: interregional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:85-91.
6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
7. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis* 2010;50:364–73.
8. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005; 165:1430-5.
9. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1413-8.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
11. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47: 3514–9.
12. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:659-67.
13. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2013;62:429-36.
14. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432-8.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012).
16. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:168-72.
17. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-8.
18. Vading M, Samuelsen O, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, EtestR and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:668-74.
19. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:552-6.
20. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3877-80.
21. Porres-Osante N, de Champs C, Dupont H, Torres C, Mammeri H. Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 79:399-400.
22. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:252-4.
23. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2013. In press.

24. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E230-2.
25. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouveleki LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E412-5.
26. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1503-7.
27. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6437-40.
28. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3097-101.
29. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:4578-80.
30. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDECR CARBA NP, the Rapid CARB ScreenR and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2015 ; 70):3014-22.
31. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDECR CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71:1213-6.
32. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3060-3.
33. Noel A, Huang TD, Berhin C, Hoebeker M, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb;55(2):510-518.
34. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(6):1996-8.
35. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β -Carba Test. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065-3068.
36. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690.
37. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2016;128:48-51.
38. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71(1):274-6.
39. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3.
40. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:2163-71.
41. Papagiannitsis CC, Študentova V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1731.
42. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163

- Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2832-2836.
43. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1834-40.
44. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):471-3.
45. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2357-9.
46. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1217-22.

3. Энтеробактерии, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (ESBL)

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Нет
Для целей инфекционного контроля	Да
Для целей общественного здравоохранения	Да

3.1 Определение

ESBL (β -лактамазы расширенного спектра) – ферменты, гидролизующие большинство пенициллинов и цефалоспоринов, в том числе оксимино- β -лактамы (цефуроксим, цефалоспорины третьего и четвертого поколения и азтреонам), но не цефамицины и карбапенемы. Большинство ESBL относятся к β -лактамазам класса А по классификации Ambler и подавляются ингибиторами β -лактамаз (клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом) (1).

3.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение выявления механизмов устойчивости

С момента первого обнаружения в 1983 году штаммов, продуцирующих ESBL, их выявление наблюдается повсеместно. Распространение данных ферментов является результатом клональной экспансии штаммов-продуцентов, горизонтальной передачи генов, кодирующих ESBL, с помощью плазмид и, реже, появления *de novo*. Наиболее значимыми с клинической точки зрения группами ESBL являются ферменты CTX-M типа, появление которых известно с начала 2000 гг., за которыми следуют ESBL производные SHV- и TEM- β -лактамаз (2-5).

Продукция ESBL наблюдается в основном у энтеробактерий. Продуценты ESBL вначале выявлялась в медицинских стационарах, позже – в учреждениях длительного пребывания, а начиная примерно с 2000 года – и за пределами стационаров (амбулаторные пациенты, здоровые носители, больные и здоровые животные, пищевые продукты). Наиболее частыми продуцентами ESBL являются *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Вместе с тем, продукция ESBL встречается и у всех других клинически значимых видов энтеробактерий. Распространенность ESBL-продуцирующих изолятов зависит от ряда факторов, таких как биологический вид, географическое расположение, тип стационара/отделения, группа пациентов и тип инфекции, в результате чего в разных исследованиях были зарегистрированы достаточно широкие вариации

(2,3,6,7). По данным EARS-Net, полученных в 2015 году, распространенность инвазивных инфекций, вызванных изолятами *K. pneumoniae*, нечувствительными к цефалоспорином третьего поколения, во многих европейских странах превысила 25% и даже 50%. Результаты исследований, проведенных в национальных лабораториях, позволяют предположить, что большинство этих изолятов являлись продуцентами ESBL, за исключением стран с широким распространением изолятов, продуцирующих KPC-карбапенемазы – Греции и Италии (8).

3.3 Механизмы устойчивости

Подавляющее большинство ESBL являются приобретенными ферментами, кодируемыми расположенными на плазмидах генами. Приобретенные ESBL характеризуются различным уровнем экспрессии и существенно отличаются по таким биохимическим характеристикам, как, например, активность в отношении различных β -лактамов (например цефотаксим, цефтазидим, азтреонам). Вариации в уровне экспрессии и свойствах конкретного фермента, а также одновременное наличие других механизмов резистентности (других β -лактамаз, эффлюкса, нарушения проницаемости) приводят к формированию большого разнообразия фенотипов резистентности среди ESBL-продуцирующих изолятов (1-4, 9-11).

3.4 Рекомендуемые методы выявления ESBL у энтеробактерий

Во многих странах мира выявление и характеристика ESBL рекомендуется, либо является обязательной в целях инфекционного контроля. Рекомендуемая стратегия обнаружения ESBL у энтеробактерий основана на выявлении нечувствительности к индикаторным оксимино-цефалоспорином, с последующим проведением фенотипических (а в некоторых случаях генотипических) тестов, подтверждающих продукцию ESBL (таблица 1, рисунок 1).

В соответствии с рекомендациями EUCAST и CLSI скрининг с целью выявления ESBL проводится при выявлении изолятов с МПК цефотаксима, цефтриаксона, цефтазидима или цефподоксима > 1 мг/л (таблица 1) (12, 13). По методологии EUCAST клиническое пограничное значение для чувствительных штаммов энтеробактерий также равно 1 мг/л ($C \leq 1$ мг/л) (12). Для скрининга продукции ESBL в качестве единственного препарата может быть использован цефподоксим, как наиболее чувствительный индикаторный цефалоспорин. Вместе с тем, применение цефподоксима характеризуется меньшей специфичностью, чем использование для этой цели комбинации цефотаксима

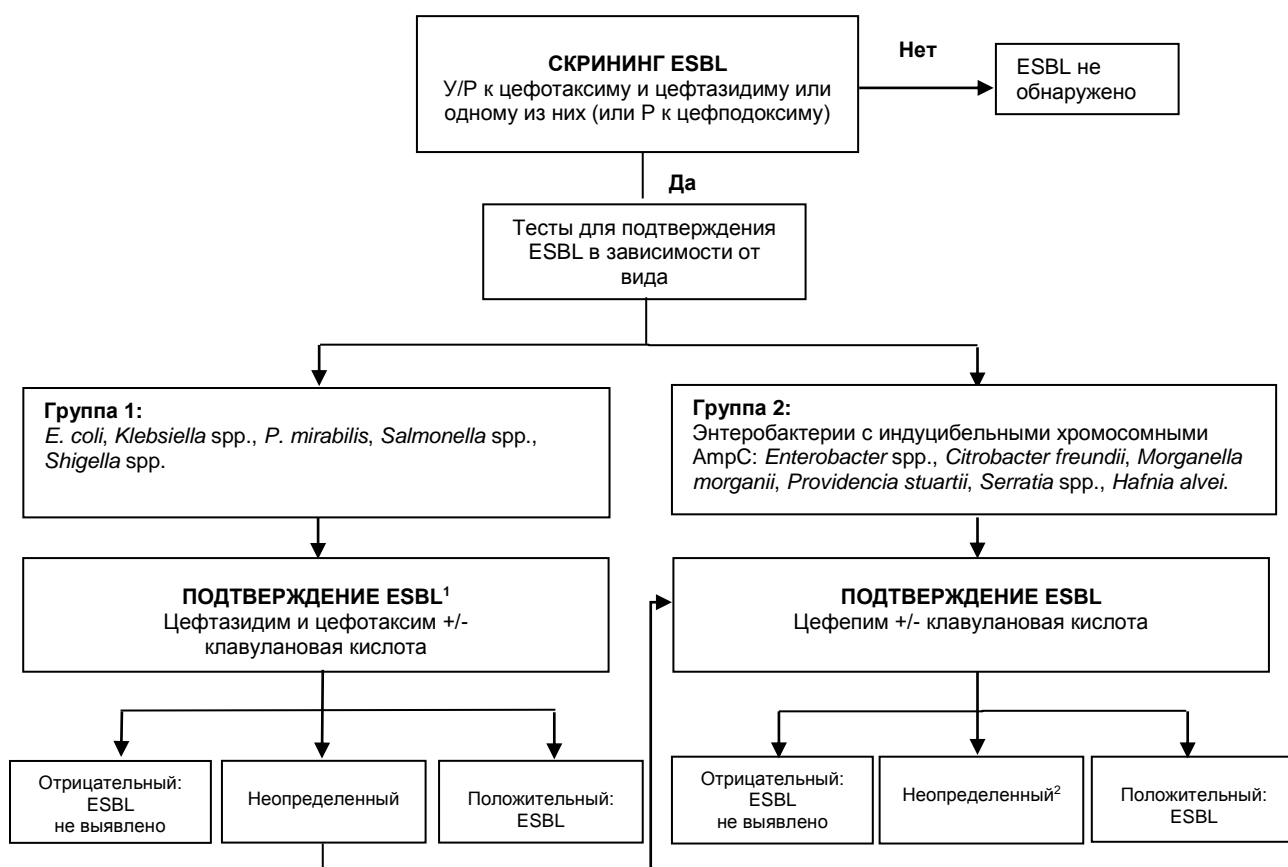
(или цефтриаксона) и цефтазидима (14, 15), поэтому при проведении исследований, подтверждающих продукцию ESBL, рекомендуется использовать данные комбинации антибиотиков. В таблице 1 представлены соответствующие диаметры зон подавления роста для индикаторных цефалоспоринов.

Таблица 1. Методы скрининга ESBL у энтеробактерий (13-19).

Метод	Антибиотик	Выполнить тест, подтверждающий продукцию ESBL, ЕСЛИ
Метод разведений в бульоне или агаре ¹	Цефотаксим/цефтриаксон И цефтазидим	МПК >1 мг/л для одного из препаратов
	Цефподоксим	МПК >1 мг/л
Диско-диффузионный ¹	Цефотаксим (5 мкг) или Цефтриаксон (30 мкг)	Зона подавления <21 мм
	И Цефтазидим (10 мкг)	Зона подавления <23 мм
		Зона подавления <22 мм
	Цефподоксим (10 мкг)	Зона подавления <21 мм

¹Все указанные методы предполагают использование двух антибиотиков: цефотаксима (или цефтриаксона) И цефтазидима ИЛИ только цефподоксима.

Рисунок 1. Алгоритм выявления ESBL фенотипическими методами



¹ Если проводилось определение чувствительности к цефокситину и МПК цефокситина >8 мг/л, следует выполнить подтверждающий тест с цефепимом +/- клавулановой кислотой

² Результаты теста не могут быть учтены ни как положительные, ни как отрицательные (например, если результаты градиентного метода невозможно учесть из-за превышения МПК максимального значения на полоске или из-за отсутствия четкого синергизма при выполнении методов комбинированных дисков и двойных дисков). Если использование цефепима +/- клавулановой кислоты не позволяет подтвердить продукцию ESBL, то требуется проведение генотипического исследования.

3.4.1 Скрининг ESBL у энтеробактерий

А. Скрининг ESBL у энтеробактерий 1-й группы (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.),

Рекомендуемыми методами скрининга ESBL у энтеробактерий 1-й группы являются: метод разведений в бульоне, метод разведений а агаре, диско-диффузионный метод и автоматизированные системы определения чувствительности (13, 20, 21). Учитывая вероятность больших различий в значениях МПК между цефотаксимом (или цефтриаксоном) и цефтазидимом для различных ESBL-продуцирующих изолятов, в качестве индикаторных препаратов должны использоваться как цефотаксим (или цефтриаксон), так и цефтазидим (14, 22, 23).

Описание алгоритма скрининга и фенотипических методов подтверждения продукции ESBL при положительном результате скрининга для энтеробактерий 1-й группы, представлено на рисунке 1 и в таблице 2.

В. Скрининг ESBL у энтеробактерий 2-й группы (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*)

Для скрининга продукции ESBL у энтеробактерий 2-й группы рекомендуется использовать методы, описанные выше для энтеробактерий 1-й группы (Рисунок 1, Таблица 3) (19). В то же время следует учитывать, что у данной группы бактерий широко распространенным механизмом резистентности к цефалоспорином является дерепрессия хромосомной AmpC β-лактамазы. Поэтому для фенотипических методов исследования с использованием клавулановой кислоты следует использовать цефепим, так как он не гидролизуется AmpC β-лактамазами.

3.4.2 Фенотипические методы подтверждения продукции ESBL

Для подтверждения продукции ESBL рекомендуется применение четырех из ряда описанных к настоящему времени фенотипических методов, основанных на подавлении активности ESBL клавулановой кислотой *in vitro*, а именно: метод комбинированных дисков (МКД), метод двойных дисков (ДД), градиентный метод выявления ESBL и метод микроразведений в бульоне

(Таблица 2 и 3) (20, 21, 24). Результаты одного многоцентрового исследования показали, что МКД обладает лучшей специфичностью по сравнению с градиентным методом и сопоставим с ним по чувствительности (25). В автоматизированных системах определения чувствительности используются тесты выявления ESBL, основанные на подавлении ESBL клавулановой кислотой. Эффективность методов подтверждения ESBL зависит от условий проведения исследований, исследуемых штаммов и используемого оборудования (17-19).

А. Метод комбинированных дисков (МКД)

Для проведения каждого исследования применяются диски или таблетки, содержащие цефалоспорин (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) и его комбинацию с клавулановой кислотой. Зона подавления роста вокруг диска или таблетки с комбинацией цефалоспорины и клавулановой кислоты сравнивается с аналогичной зоной вокруг диска или таблетки, содержащими только цефалоспорин. Результат оценивается как положительный, если диаметр зоны подавления роста вокруг диска или таблетки с комбинацией цефалоспорины и клавулановой кислоты на ≥ 5 мм больше, чем вокруг диска или таблетки, без клавулановой кислоты (см. таблица 3) (26, 27).

В. Метод двойных дисков (ДД)

Для исследования используются диски с цефалоспоринами (цефотаксимом, цефтазидимом, цефепимом) и диски с клавулановой кислотой (амоксициллин-клавулановая кислота). Результат исследования оценивается как положительный, если размер зоны подавления роста вокруг любого из дисков с цефалоспорином увеличивается или приобретает форму «замочной скважины» в направлении диска с клавулановой кислотой. Определяющим фактором при проведении исследования является расстояние между дисками. Для дисков, содержащих 30 мкг цефалоспорины, оптимальным является расстояние, равное 20 мм между центрами дисков. При исследовании штаммов с крайне высоким или низким уровнем резистентности данное расстояние может быть либо уменьшено (до 15 мм), либо увеличено (до 30 мм), соответственно (20). Для дисков с меньшим содержанием цефалоспоринов, которые используются при проведении диско-диффузионного метода по методологии EUCAST, рекомендации, касающиеся расстояния между дисками, должны быть оценены дополнительно.

С. Градиентный метод

Выполнение, учет и интерпретация результатов выявления ESBL градиентным методом должны проводиться в соответствии с инструкциями производителя. Результаты теста считаются положительными, если МПК цефалоспорина в сочетании с клавулановой кислотой в ≥ 8 раз меньше, чем МПК этого же цефалоспорина без клавулановой кислоты или при формировании фантомной зоны или зоны подавления роста в виде деформированного эллипса (иллюстрации см. инструкции производителя) (Таблица 3). Результаты исследования считаются неопределенными, если значение МПК не может быть учтено из-за превышения диапазона значений МПК на полоске с антибиотиком. Во всех остальных случаях результат исследования оценивается как отрицательный. Градиентный ESBL-тест можно использовать только для подтверждения продукции ESBL. Не следует использовать его для определения МПК.

Д. Метод микроразведений в бульоне

В основе лежит определение МПК исследуемого изолята методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон к цефотаксиму, цефтазидиму и цефепиму в диапазоне концентраций 0,25-512 мг/л и комбинациям перечисленных цефалоспоринов в указанных концентрациях с клавулановой кислотой (в фиксированной концентрации 4 мг/л). Результат исследования оценивается как положительный, если МПК комбинации цефалоспорина и клавулановой кислоты в ≥ 8 меньше, чем МПК соответствующего цефалоспорина. Во всех остальных случаях результат оценивается как отрицательный (24).

Е. Биохимические (колориметрические) тесты

NDP-тест для выявления ESBL (Nordmann-Dortet-Poirel), описанный впервые в 2012 году, основан на использовании цефотаксима в качестве индикаторного антибиотика и тазобактама в качестве ингибитора (28). Тест выполняется в формате 96-луночного планшета или в отдельных пробирках. Изменение окраски с красного на желтый свидетельствует о положительном результате. Тест также может применяться для выявления ESBL непосредственно в образцах клинического материала пациентов.

β -ЛАСТА тест – колориметрический тест, использующий хромогенный цефалоспорин (HMRZ-86), также может выполняться как с изолятами, так и непосредственно с клиническим материалом (30). Результаты проспективного

многоцентрового исследования, проведенного в Бельгии и Франции, показали высокую чувствительность и специфичность метода для *E. coli* и *K. pneumoniae* (96% и 100% соответственно), но, в то же время, низкую специфичность (67%) для видов, продуцирующих индуцибельные AmpC β-лактамазы. Высокая прогностическая ценность отрицательного результата для *E. coli* и *K. pneumoniae* (99% в регионах с частотой резистентности к ЦС III, равной 10-30%) свидетельствует о высокой эффективности этого простого теста для прогнозирования резистентности к цефалоспорином III поколения, и прежде всего, продукции β-лактамаз расширенного спектра.

Таблица 2. Методы подтверждения продукции ESBL у энтеробактерий, при положительных результатах скрининга (Таблица 1). Энтеробактерии 1-ой группы (Рисунок 1).

Метод	Антибиотик (содержание в диске)	Результат подтверждающего продукцию ESBL теста положительный, ЕСЛИ
Градиентный метод выявления ESBL	Цефотаксим +/- клавулановая кислота	Соотношение МПК ≥8 или наличие деформированного эллипса
	Цефтазидим +/- клавулановая кислота	Соотношение МПК ≥ 8 или наличие деформированного эллипса
Метод комбинированных дисков (МКД)	Цефотаксим (30 мкг) +/- клавулановая кислота (10 мкг)	Увеличение зоны подавления на ≥5 мм
	Цефтазидим (30 мкг) +/- клавулановая кислота (10 мкг)	Увеличение зоны подавления на ≥5 мм
Метод микроразведений в бульоне	Цефотаксим +/- клавулановая кислота (4 мг/л)	Соотношение МПК ≥ 8
	Цефтазидим +/- клавулановая кислота (4 мг/л)	Соотношение МПК ≥ 8
	Цефепим +/- клавулановая кислота (4 мг/л)	Соотношение МПК ≥ 8
Выявление синергизма методом двойных дисков (ДД)	Цефотаксим, цефтазидим и цефепим	Расширение зоны подавления роста вокруг диска с индикаторным цефалоспорином по направлению к диску с амоксициллином-клавулановой кислотой

Е. Специальные рекомендации по интерпретации результатов

При использовании цефотаксима в качестве индикаторного препарата результаты исследований для подтверждения продукции ESBL у штаммов *Klebsiella oxytoca* с гиперпродукцией хромосомных β-лактамаз K1 (OXY) могут быть ложноположительными (31). Подобный фенотип может также встречаться у таких видов как *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* и *Kluyvera* spp., а также у некоторых видов, родственных с *C. koseri*: *C. sedlakii*, *C. farmeri* и

C. amalonaticus, имеющих хромосомные β-лактамазы, подавляемые клавулановой кислотой (32, 33). Другой возможной причиной ложноположительных результатов является сочетание гиперпродукции SHV-1-, TEM-1- или OXA-1-подобных β-лактамаз широкого спектра и нарушения проницаемости (18). Ложноположительные результаты могут возникать также при исследовании изолятов *K. oxytoca*, продуцирующих β-лактамазы K1, или *E. coli*, продуцирующих β-лактамазы OXA-1, если для подтверждения продукции ESBL в качестве индикатора используется только цефепим (34).

Таблица 3. Методы подтверждения продукции ESBL у энтеробактерий, при положительных результатах скрининга (Таблица 1). Энтеробактерии 2-ой группы (Рисунок 1).

Метод	Антибиотик	Результат подтверждающего продукцию ESBL теста положительный, ЕСЛИ
Градиентный метод выявления ESBL Etest® ESBL	Цефепим +/- клавулановая кислота	Соотношение МПК ≥8 или наличие деформированного эллипса
Метод комбинированных дисков	Цефепим (30 мкг) +/- клавулановая кислота (10 мкг)	Увеличение зоны подавления на ≥5 мм
Метод микроразведений в бульоне	Цефепим +/- клавулановая кислота (фиксированная концентрация 4 мг/л)	Соотношение МПК ≥ 8
Выявление синергизма методом двойных дисков (ДД)	Цефотаксим, цефтазидим, цефепим	Расширение зоны подавления роста вокруг диска с индикаторным цефалоспорином по направлению к диску с амоксициллином-клавулановой кислотой

3.4.3 Фенотипические методы выявления ESBL в присутствии других β-лактамаз, маскирующих синергизм

Вследствие высокого уровня экспрессии AmpC β-лактамаз, маскирующих присутствие ESBL, результаты исследования могут быть неопределенными (Etest®) или ложноотрицательными (МКД, ДД, Etest® и метод микроразведений в бульоне) (20, 34, 35). Изоляты с высоким уровнем экспрессии AmpC β-лактамаз обычно проявляют явно выраженную устойчивость к цефалоспорином третьего поколения. Помимо этого, о высоком уровне экспрессии AmpC β-лактамаз может свидетельствовать устойчивость к цефамицинам, например, цефокситину – МПК >8 мг/л (34); редким исключением являются β-лактамазы ACC, не приводящие к развитию устойчивости к цефокситину (36).

У изолятов с высоким уровнем экспрессии AmpC β-лактамаз рекомендуется выполнить дополнительное исследование для подтверждения продукции ESBL, используя в качестве индикатора цефепим, который обычно не гидролизует

AmpC β-лактамазами. Цефепим может использоваться при проведении всех видов исследования: МКД, ДД, градиентного метода, метода микроразведений в бульоне (27, 37-39). В качестве альтернативного варианта можно рассмотреть использование клоксациллина, который является эффективным ингибитором AmpC-ферментов. В этом случае для МКД используются диски, содержащие два индикаторных цефалоспорины (цефотаксим и цефтазидим) в сочетании с клавулановой кислотой и клоксациллином, а для проведения стандартных методов МКД или ДД используются чашки с агаром, в который добавляется клоксациллин в концентрации 200-250 мг/л (19). В коммерческой сети доступны диски и таблетки, содержащие как клавулановую кислоту, так и клоксациллин, однако многоцентровые исследования по оценке эффективности этих продуктов отсутствуют.

Присутствие ESBL может также маскироваться такими карбапенемазами, как MBL (металло-β-лактамазы) или KPC (карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae*) (но не OXA-48-подобными ферментами) и/или наличием выраженных нарушений проницаемости (40, 41). В таких случаях, если необходима идентификация ESBL сохраняется, рекомендуется использовать молекулярные методы их выявления.

3.4.4 Генотипические методы подтверждения ESBL

Для подтверждения присутствия генов ESBL генотипическими методами существуют широкие возможности: от использования ПЦР (полимеразной цепной реакции) и секвенирования кодирующих генов до полногеномного секвенирования с последующим картированием генов резистентности *in silico*. Кроме того, разработаны методы, основанные на использовании ДНК-микрочипов. Систематическая оценка как коммерческих, так и *in-house* методов не проводилась, поэтому в данном руководстве они подробно описываться не будут. **Возможности применения полногеномного секвенирования описаны в другом документе EUCAST (42).**

3.4.5 Контроль качества

Ниже перечислены некоторые возможные контрольные штаммы для фенотипических и генотипических методов. Диапазоны допустимых значений для этих контрольных штаммов не существуют. При использовании коммерческих систем следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 4. Контрольные штаммы для контроля качества методов выявления ESBL.

Штамм	Механизм
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	ESBL SHV-18
<i>E. coli</i> CCUG62975	ESBL группы CTX-M-1 и приобретенные CMY AmpC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Не продуцирует ESBL

3.5 Литература

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233.
2. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584.
3. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-951.
4. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):42-52.
5. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):144-153.
6. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174.
7. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):117-123.
8. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
9. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32.
10. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):3-10.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST; 2013. Version 3.0 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (last accessed 23 December 2012).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M 100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
13. Hope R, Potz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(1):110-3.
14. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE Jr, Raney P, Tenover FC. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3829-36.
15. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1048-57.
16. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the EtestR ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3703-11.
17. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3257-62.

18. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized β -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2380-4.
19. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14 (Suppl 1):90-103.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:657-86.
21. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;54:13-21.
22. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;52:323-9.
23. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3409-12.
24. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Voets GM, Scharringa J et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:70-6.
25. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the EtestR ESBL. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45:881-5.
26. Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48:298-9.
27. Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL EtestR to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:134-8.
28. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3016-22.
29. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(3):504-7.
30. Renvoise A, Decre D, Amarsy-Guerle R, Huang TD, Jost C, et al. Evaluation of the β -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):4012-7.
31. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR. Structure of an extended-spectrum class A β -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. *J Mol Biol*. 2002;317:109-17.
32. Petrella S, Renard M, Ziental-Gelus N, Clermont D, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of the chromosomal class A β -lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254:285-92.
33. Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL EtestR to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54:134-8.
34. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82.
35. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, et al. Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -lactamases more often than to ESBLs. *J Clin Microbiol*. 2010;48:673-4.
36. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1924-31.
37. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:1194-204.
38. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -lactamase production. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009;42:310-6.

39. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3409-12.
40. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended- spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemasepossessing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3420-6.
41. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Bottcher A et al. Colonization of residents and staff of a longterm-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:934-44.
42. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(1):2-22.

4. Энтеробактерии, продуцирующие приобретенные AmpC β-лактамазы

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Нет
Для целей инфекционного контроля	Да
Для целей общественного здравоохранения	Да

4.1 Определение

По классификации Ambler цефалоспорины типа AmpC являются β-лактамазами класса C. Они гидролизуют пенициллины, цефалоспорины (включая цефалоспорины третьего поколения, но, обычно, не гидролизуют цефалоспорины четвертого поколения) и монобактамы. Ферменты типа AmpC, как правило, плохо ингибируются классическими ингибиторами ESBL, в частности clavulanовой кислотой (1).

4.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение выявления механизмов устойчивости

Первые изоляты энтеробактерий, продуцирующих приобретенные AmpC β-лактамазы, были обнаружены в конце 1980-х годов, и с тех пор в результате клонального распространения и горизонтального переноса генов AmpC (часто называемых плазмидно-опосредованными AmpC) распространились по всему миру. Существует несколько линий мобильных генов AmpC, произошедших от природных продуцентов, а именно группы *Enterobacter* (MIR, ACT), группы *S. freundii* (CMY-2-подобных, LAT, CFE), группы *M. morgani* (DHA), группы *Hafnia alvei* (ACC), группы *Aeromonas* (CMY-1-подобные, FOX, MOX) и группы *Acinetobacter baumannii* (ADC). Наиболее многочисленными и широко распространенными являются CMY-2-подобные ферменты, а также, хотя и в меньшей степени, индуцибельные DHA-подобные и некоторые другие β-лактамазы (1).

Основными видами продуцентов приобретенных AmpC являются *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* и *P. mirabilis*. Изоляты, продуцирующие эти ферменты были выявлены как у госпитализированных, так и у амбулаторных пациентов, а у сельскохозяйственных животных и в продуктах питания (у *E. coli* и *S. enterica*) – обнаружены ранее, чем классические ESBL. Не смотря на повсеместное распространение приобретенных AmpC, о чем свидетельствуют результаты многоцентровых исследований механизмов резистентности к цефалоспорином третьего поколения у энтеробактерий, общая частота их

продуцирования остается намного более низкой по сравнению с ESBL, по крайней мере, в Европе. Тем не менее, при определенных эпидемиологических условиях значение микроорганизмов, продуцирующих эти ферменты, может существенно возрасти (1-5).

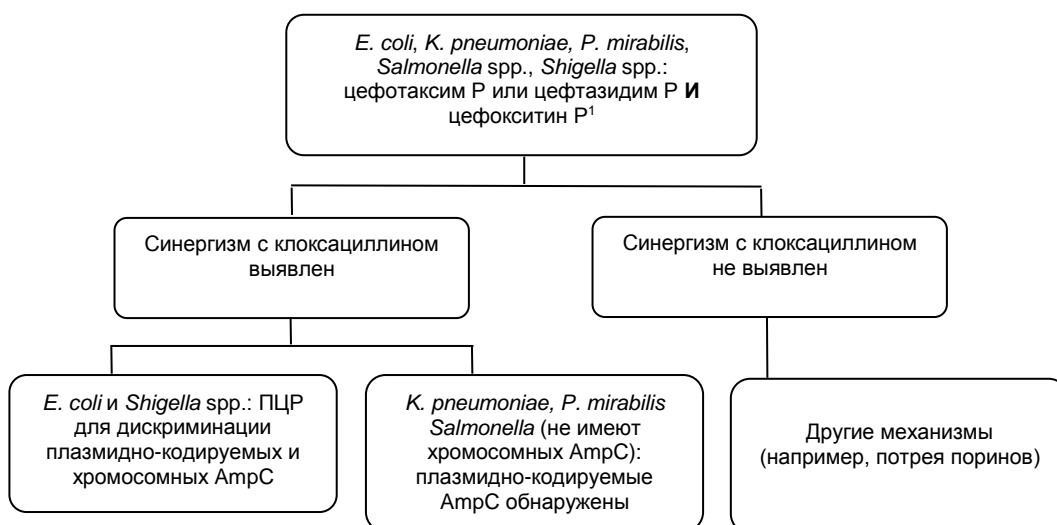
4.3 Механизмы устойчивости

Многочисленные виды энтеробактерий и некоторые другие грамотрицательные бактерии продуцируют природные AmpC бета-лактамазы: конститутивно с крайне низким уровнем экспрессии (например, *e.g. E. coli, Shigella spp.*), или индуцибельно (например, *Enterobacter spp., C. freundii, M. morganii, P. aeruginosa*). Возникающие вследствие различных генетических изменений дерепрессия или гиперпродукция природных AmpC бета-лактамаз приводят к устойчивости высокого уровня к цефалоспорином и комбинациям пенициллинов с ингибиторами β -лактамаз. Цефалоспорины класса C также могут встречаться в виде приобретенных ферментов, в основном у энтеробактерий. За исключением индуцибельных DNA-ферментов, приобретенные AmpC экспрессируются конститутивно и приводят к устойчивости, сравнимой с устойчивостью при дерепрессии или гиперпродукции AmpC у природных продуцентов. Уровень устойчивости зависит как от количества экспрессируемых ферментов, так и от наличия других механизмов резистентности. Как и в случае ESBL, кодирующие гены приобретенных AmpC обычно находятся на плазмидах (1-3).

4.4 Рекомендуемые методы выявления AmpC бета-лактамаз у энтеробактерий

В качестве фенотипических критериев для выявления продукции AmpC бета-лактамаз у энтеробактерий 1-ой группы могут использоваться МПК цефокситина >8 мг/л (диаметр зоны <19 мм) в сочетании с фенотипической устойчивостью к цефтазидиму и/или цефотаксиму (в соответствии с установленными пограничными значениями). Такой метод не позволяет выявлять плазмидно-опосредованные AmpC- β -лактамазы ACC-1, не гидролизующие цефокситин (6). Кроме того, резистентность к цефокситину может являться также следствием потери поринов (1).

Рисунок 1. Алгоритм выявления AmpC бета-лактамаз.



¹На данной схеме: цефокситин Р – изоляты недикого типа (МПК >8 мг/л или диаметр зоны <19 мм). Цефотаксим и цефтазидим Р – согласно актуальным пограничным значениям EUCAST. Подход, основанный на использовании нечувствительности к цефотаксиму и цефтазидиму, характеризуется более высокой чувствительностью, но низкой специфичностью по сравнению с выявлением устойчивости к цефокситину (7). AmpC бета-лактамазы могут также присутствовать у изолятов с положительными результатами выявления ESBL (синергизм с клавулановой кислотой). Поэтому целесообразно проводить исследование независимо от результатов выявления ESBL. Если определение чувствительности к цефокситину не проводится, одним из дополнительных фенотипических признаков продукции AmpC, хотя и менее специфичным, является чувствительность к цефепиму в сочетании с устойчивостью к цефотаксиму и/или цефтазидиму.

Фенотипические тесты для подтверждения продукции AmpC бета-лактамаз основаны, как правило, на выявлении эффекта подавлении AmpC либо клоксациллином, либо производными бороновой кислоты. При этом следует учитывать, что производные бороновой кислоты подавляют также и карбапенемазы класса А, а также некоторые пенициллиназы класса А (такие как K1 у *K. oxytoca*). Для выявления AmpC β-лактамаз наряду с некоторыми описанными достаточно точными in-house методами (8-10), существуют доступные коммерческие методы, такие как «AmpC Detection Disc Set» (чувствительность 96-100%, специфичность 98-100%) (11, 12), градиентный AmpC тест, в настоящее время производимый только компанией bioMérieux (чувствительность 84-93%, специфичность 70-100%) (12, 13) и таблетки с цефотаксимом-клоксациллином и цефтазидимом-клоксациллином (чувствительность 96%, специфичность 92%) компании Rosco (7, 14). Однако данные по оценке этих методов ограничены. Вместе с тем у *E. coli* методы, подтверждающие продукцию AmpC, не позволяют дифференцировать приобретенные AmpC и конститутивную гиперпродукцию хромосомных AmpC-β-лактамаз.

с помощью методов ПЦР (15, 16), или метода, основанного на использовании ДНК-микрочипов (17).

Ниже перечислены некоторые возможные контрольные штаммы для фенотипических и генотипических методов. Диапазоны допустимых значений для этих контрольных штаммов не существуют. При использовании коммерческих систем следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 1. Контрольные штаммы для контроля качества методов выявления AmpC.

Штамм	Механизм
<i>E. coli</i> CCUG 58543	Приобретенные CMY-2 AmpC
<i>E. coli</i> CCUG62975	Приобретенные CMY AmpC и ESBL группы CTX-M-1
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58545	Приобретенные DNA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Нет AmpC

4.5 Литература

1. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82.
2. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11.
3. Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15:141-152.
4. Empel J, Hrabak J, Kozińska A, Bergerova T, Urbaškova P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. Microb Drug Resist. 2010;16:291-295.
5. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:2735-2742.
6. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1924-31.
7. Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli* - evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:1205-10.
8. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005;43:2551-8.
9. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S et al. Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol. 2009;47:294-9.
10. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:146-9.
11. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:82-9.
12. Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2303-4.
13. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in Enterobacteriaceae. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 6):715-21.
14. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2011;49:2924-32.
15. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. APMIS. 2012;120:724-32.
16. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2153-62.
17. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfstrom L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. 2010; 82:229-33.
18. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. 2012;67:1865-9.

5. Резистентность к полимиксинам у грамотрицательных бактерий

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения критической категории чувствительности	Да
Важно с целью инфекционного контроля	Да
Важно для целей общественного здравоохранения	Да

Приобретенная резистентность к полимиксинам у энтеробактерий в последние годы появляется во всем мире. Особую тревогу вызывает факт выявления плазмидно-опосредованной резистентности к полимиксинам у штаммов, выделенных как у животных и из продуктов питания, так и у человека, в связи с ее высокой способностью к горизонтальному распространению.

Ранее выявленные случаи устойчивости к полимиксинам всегда были хромосомно-опосредованными и связанными с мутациями в нескольких генах, включая двухкомпонентную регуляторную систему биосинтеза липида А и, следовательно, регуляцией соответствующих липополисахаридов (ЛПС) (1, 2). Первое сообщение о плазмидно-опосредованной устойчивости к колистину появилось в 2015 году – плазмидно-кодируемая фосфоэтаноламинтрансфераза, которая добавляет фосфоэтаноламинную группу к липиду А. В результате этого снижается отрицательный заряд ЛПС, что в свою очередь приводит к снижению силы взаимодействия с положительно заряженными молекулами полимиксинов. Вновь описанный детерминант резистентности была названа MCR-1 (3). С тех пор установлено, что такой механизм устойчивости встречается на всех континентах. Ретроспективные исследования показали наличие такого механизма устойчивости у одного изолята, выделенного в 1980-х годах, но их повсеместное распространение, вероятно, произошло приблизительно в течение последних 5 лет (4). В 2016 году были описаны два новых варианта MCR-1 – MCR 1.2 и MCR-2 (5, 6).

Среди инвазивных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Европе, общая частота устойчивости к колистину составляет 8,6% и может быть такой же высокой, как и частота выявления карбапенеморезистентных изолятов – 29% (7). Необходимо отметить высокую вариабельность данных между разными странами и возможное влияние используемой методологии на большое число устойчивых изолятов. Предполагается, что в большинстве случаев устойчивость вызвана хромосомными механизмами, но имеется несколько

сообщений о выявлении карбапенемазопродуцирующих изолятов энтеробактерий, обладающих MCR-1 (4).

В настоящее время нет всесторонне оцененных методов для фенотипической характеристики различных механизмов устойчивости к полимиксинам, кроме определения МПК методом микроразведений в бульоне (диско-диффузионный метод и метод градиентной диффузии не обеспечивают получение надежных результатов для данного класса антибиотиков). Недавно было обнаружено, что гидролитическая активность MCR-ферментов зависит от присутствия цинка – хелатирование цинка может снижать активность ферментов (8). Поэтому ожидается появление методики основанных на выявлении ингибирования ферментов ЭДТА или дипиколиновой кислотой. В настоящее время основное внимание следует уделять выявлению резистентности к полимиксинам независимо от механизма. Для определения чувствительности к колистину в лаборатории следует всегда использовать метод микроразведений в бульоне и субстанцию колистина сульфата (9). Особенно важно подчеркнуть, что диско-диффузионный и градиентный методы использовать нельзя, так как это приводит к высокому риску получения очень больших и больших ошибок определения чувствительности (10). Недавно был представлен колориметрический метод, но оценка его эффективности до сих пор проведена только в одном центре (11). При необходимости выявления механизма устойчивости должны применяться молекулярные методы. В настоящее время рекомендовано проводить такие исследования только для изолятов, резистентных к колистину.

Для контроля качества определения чувствительности к колистину должны использоваться как чувствительные контрольные штаммы (*E. coli* ATCC 25922 или *P. aeruginosa* ATCC 27853), так и штаммы, резистентные к колистину – *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1*). Целевое значение МПК колистина для *E. coli* NCTC 13846 – 4 мг/л; в отдельных случаях значения МПК могут быть 2 или 8 мг/л.

5.1 Литература

1. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. Clin Microbiol Infect. 2015;21(10):899-905.
2. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014; 5:643.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 ;16(2):161-8.
4. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill. 2016;21(9).

5. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, et al. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:5612-5.
6. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(27).
7. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
8. Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Sci Rep.* 2017;7:39392.
9. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):1953-8.
10. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4625-30.
11. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1038-43.

6. Продукция карбапенемаз у *P. aeruginosa* и *Acinetobacter*

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения критической категории чувствительности	Нет
Важно с целью инфекционного контроля	Да
Важно для целей общественного здравоохранения	Да

Карбапенемазопродуцирующие *P. aeruginosa* и бактерии группы *Acinetobacter baumannii* часто встречаются в различных частях Европы (1). Доминирующий тип ферментов у *P. aeruginosa* в Европе – VIM, главным образом – VIM-2, в странах Латинской Америки встречаются также продуценты KPC (2). Наиболее распространенные карбапенемазы у *Acinetobacter* принадлежат к классу OXA, и относятся, в основном к группам OXA-23-, OXA 24/40-, OXA-58-, OXA-143-, OXA-235-подобных ферментов (3).

В настоящее время не описано специфических ингибиторов OXA-карбапенемаз класса D, поэтому не существует фенотипических методов, обеспечивающих удовлетворительные результаты выявления/идентификации карбапенемаз этого типа у *Acinetobacter*. Попытки использования колориметрических тестов у бактерий этого рода, в целом, не показали необходимой точности (4). Бактерии рода *Acinetobacter* также могут продуцировать крабапенемазы типа MBL, в этом случае колориметрический анализ, возможно, будет обеспечивать лучшие результаты.

В течение нескольких десятилетий для выявления ферментов MBL-типа у *P. aeruginosa* применялись MBL Etest® или исследование на основе диско-диффузионного метода. В настоящее время использование этих методов не рекомендуется в связи с их низкой специфичностью (5-7). Недавно несколькими авторами были предложены различные варианты метода комбинированных дисков (имипенем или меропенем в комбинации с различными ингибиторами β-лактамаз класса B (ЭДТА или дипиколиновой кислотой). Но эти методы были валидированы только в одноцентровых исследованиях и их эффективность при указанных параметрах была труднодостижима в других центрах (8, 9). Колориметрические методы для выявления карбапенемазной активности у *P. aeruginosa* более эффективным, чем у *Acinetobacter* (10), и на настоящий момент вероятно характеризуются наилучшей доказанной специфичностью. Тем не менее, теста, обладающего достаточным уровнем специфичности для того чтобы быть рекомендованным в качестве самостоятельно используемого без молекулярного подтверждения, не существует.

Как правило, для характеристики изолятов *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* с предполагаемой продукцией карбапенемаз должны быть использованы генотипические методы. Но некоторые выше описанные фенотипические подходы могут быть использованы для начального исследования, особенно для *P. aeruginosa*.

Необходимо отметить, что выявление карбапенемаз может иметь большее клиническое значение у *P. aeruginosa*, так как устойчивость к карбапенемам у представителей данного вида может быть связана с множественными хромосомными механизмами (активный эффлюкс, повреждение или потеря поринов). У *Acinetobacter*, наоборот, устойчивость к карбапенемам практически всегда вызвана продукцией ОХА-карбапенемаз.

Для контроля качества выявления карбапенемаз предлагается использовать штаммы *P. aeruginosa* NCTC 13437 (продуцент карбапенемазы VIM-10) и *A. baumannii* NCTC13301 (продуцент карбапенемазы ОХА-23). Диапазоны допустимых значений для этих штаммов не установлены.

6.1 Литература

1. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
2. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2016; 42:276-92.
3. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2121-6.
4. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):510-518.
5. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41, 4623-4629.
6. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(4):486-8.
7. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(4):827-30.
8. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, Mille A, Gomez AS, Plésiat P. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3846-8.
9. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(7):1467-74.
10. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(5):1213-6.

7. Метициллинорезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Да
Важно для целей инфекционного контроля	Да
Важно для общих целей общественного здравоохранения	Да

7.1 Определение

Изоляты *S. aureus*, имеющие дополнительный пенициллинсвязывающий белок (PCB2a/PCB2c кодируемый генами *mecA* или *mecC*), к которым β -лактамы имеют низкую степень сродства, за исключением цефалоспоринов нового класса, обладающих анти-MRSA активностью (цефтаролин и цефтобипрол).

7.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение

Метициллинорезистентный *S. aureus* является одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире (1, 2). Летальность при инфекциях кровотока, связанных с MRSA, вдвое превышает аналогичный показатель при инфекциях, вызванных метициллиночувствительными штаммами, из-за несвоевременного начала адекватного лечения и значительно более низкой эффективности альтернативных режимов терапии (3). Инфекции, вызванные MRSA, распространены как среди госпитализированных, так и среди амбулаторных пациентов во всех странах мира.

7.3 Механизмы устойчивости

Основным механизмом устойчивости является продукция дополнительного пенициллинсвязывающего белка PCB2a/PCB2c, результатом чего является резистентность изолята ко всем β -лактамам, за исключением нового класса так называемых анти-MRSA цефалоспоринов. Эти препараты имеют достаточно высокую для активности в отношении MRSA афинность с PCB2a, а также, вероятно, с PCB, кодируемым геном *mecC* (4). Дополнительные пенициллинсвязывающие белки кодируются геном *mecA* или недавно описанным геном *mecC* (5). Элемент *mec* является чужеродным для *S. aureus* и не встречается у метициллиночувствительных изолятов *S. aureus*. Выраженная гетерогенная экспрессия гена *mecA*, часто приводящая к невысокому уровню МПК оксациллина, затрудняет получение точных результатов определения чувствительности (5). Кроме того, некоторые изоляты, не имеющие *mecA* и *mecC* генов и, следовательно, не продуцирующие дополнительные пенициллинсвязывающие белки, проявляют резистентность к оксациллину

низкого уровня [borderline susceptible *S. aureus* (BORSA)]. Эти штаммы встречаются относительно редко, механизм их устойчивости изучен мало; возможно устойчивость в таких случаях может быть связана с гиперпродукцией β-лактамаз или изменением имеющихся пенициллинсвязывающих белков (6).

Изоляты *S. aureus*, имеющие ген *mecA*, чувствительные к цефокситину и оксациллину (OS-MRSA) вследствие инактивации *mecA*, встречаются в разных частях мира. Эти штаммы могут вести себя как гетерогенные MRSA, а также проявлять чувствительность оксациллину, но резистентность к цефокситину (7,8). Оценивается, что частота таких изолятов достигает 3% согласно объединенным результатам традиционных фенотипических методов и положительных по *mecA* результатов ПЦР. Полностью документированное изменение метициллинчувствительности на метициллинорезистентность в процессе антибактериальной терапии описано только в одной работе (9), но возможно наблюдалось и в других случаях. Однако частота такой переходной резистентности в настоящее время неизвестно. Такие изоляты могут быть выявлены только при молекулярном исследовании. Необходимо отметить, что это не означает необходимость проведения молекулярного анализа для всех изолятов, но этот феномен может иметь значение в случае терапевтической неэффективности. Если ген *mecA* обнаружен случайно или в процессе скрининга вследствие терапевтической неэффективности, изолят всегда должны оцениваться как резистентный.

7.4 Рекомендуемые методы выявления метициллинорезистентности у *S. aureus*

Резистентность к метициллину/оксациллину может быть выявлена фенотипическими методами: определение МПК, диско-диффузионным. Латексная агглютинация может использоваться для выявления белка ПСБ2а, но достоверно не выявляет ПСБ2с. Генотипические методы исследования (ПЦР) обеспечивают получение надежных результатов.

7.4.1 Выявление метициллинорезистентности методом определения МПК или диско-диффузионным методом

Гетерогенная экспрессия резистентности наиболее сильное влияние оказывает на МПК оксациллина, которая может оказаться в диапазоне чувствительности. Цефокситин является чувствительным и специфичным маркером *mecA/mecC*-опосредованной резистентности к метициллину, поэтому он является препаратом выбора. Учитывая слабую корреляцию результатов определения чувствительности к оксациллину диско-диффузионным методом с наличием

гена *tesA*, метод не был включен в список рекомендованных, а диаметры зон подавления роста для интерпретации результатов – в таблицу пограничных значений EUCAST.

A. Метод микроразведений в бульоне:

Используется стандартная методика (ISO 20776-1). Если МПК цефокситина >4 мг/л, изолят оценивается как метициллинорезистентный.

B. Диско-диффузионный метод: диско-диффузионный метод выполняется по методологии EUCAST. Если диаметр зоны подавления роста вокруг диска с цефокситином (30 мкг) <22 мм, изолят оценивается как метициллинорезистентный.

7.4.2 Выявление метициллинорезистентности генотипическим методом и методом латекс-агглютинации

Для выявления генов *tesA* и *tesC* методом ПЦР (10, 11) и выявление белка ПСБ2а с помощью латексной агглютинации могут использоваться как коммерческие наборы реагентов и оборудования, так и тесты, разработанные в лаборатории. ПСБ2с не в настоящее время не обнаруживается с помощью большинства коммерческих методов.

7.4.3 Контрольные штаммы

Некоторые возможные контрольные штаммы для фенотипических и генотипических методов определения чувствительности к метициллину указаны в таблице 2. Диапазоны допустимых значений для этих штаммов не установлены. При использовании коммерческих наборов следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 2. Контрольные штаммы, используемые для контроля методов определения чувствительности к метициллину.

Штамм	Механизм
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Чувствительный к метициллину
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	Резистентный к метициллину (ген <i>tesA</i>)
<i>S. aureus</i> NCTC 13552	Резистентный к метициллину (ген <i>tesA</i>)

7.5 Литература

1. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003;36:53-9.
2. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital

- stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1598-605.
3. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Med.* 2011;8(10):e1001104.
 4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:629-41.
 5. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:595-603.
 6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:781-91.
 7. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; 13:79–86.
 8. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol.* 2016; 16:115
 9. Proulx MK, Palace SG, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, Ellison RT 3rd, Goguen JD. Reversion From Methicillin Susceptibility to Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* During Treatment of Bacteremia. *J Infect Dis.* 2016; 213:1041-8.
 10. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LGA251}*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 4:395-400.
 11. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA_{LGA251}*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2338-41.

8. Резистентность к ванкомицину у *Staphylococcus aureus*

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Да
Важно для целей инфекционного контроля	Да
Важно для общих целей общественного здравоохранения	Да

8.1 Определение

При оценке чувствительности по методологии EUCAST пограничным значением ванкомицина для резистентных изолятов *Staphylococcus aureus* является МПК ванкомицина >2 мг/л. В последние годы пограничные значения для ванкомицина были снижены, за счет чего исчезла имевшаяся ранее группа умеренной резистентности. Вместе с тем, следует учитывать существенные различия механизмов VanA-опосредованной резистентности высокого уровня к **ванкомицину** у *S. aureus* (**VRSA**) и резистентности низкого уровня, не связанной с VanA. В результате за изолятами с низким уровнем резистентности, не связанной с VanA, закрепились термины: умеренно-резистентный к **ванкомицину** *S. aureus* (**VISA**) и гетерогенный умеренно-резистентный к **ванкомицину** *S. aureus* (**hVISA**). При лечении пациентов с тяжелой формой инфекции, вызванной *S. aureus*, следует обязательно определять значение МПК. В отдельных случаях, например, при высокой вероятности неблагоприятного исхода лечения, может потребоваться использование методов выявления **hVISA**. Из-за сложности подтверждения **hVISA** для целей эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью следует использовать методы выявления **VISA** и **VRSA**.

VRSA: **Ванкомицино**резистентный *S. aureus*

Изоляты *S. aureus* с высоким уровнем резистентности к ванкомицину (МПК >8 мг/л).

VISA: Умеренно-резистентный к **ванкомицину** *S. aureus*

Изоляты *S. aureus* с низким уровнем резистентности к ванкомицину (МПК 4 - 8 мг/л).

hVISA: **Гетерогенный** умеренно-резистентный к **ванкомицину** *S. aureus*

Изоляты *S. aureus*, чувствительные к ванкомицину (МПК ≤2 мг/л) и меньшей частью популяции (1 из 10⁶ клеток), имеющей МПК ванкомицина > 2 мг/л, что устанавливается на основании результатов популяционного анализа.

Необходимо отметить, что, не смотря на продолжающееся использование этих терминов, все выше упомянутые категории должны рассматриваться как клинически резистентные.

8.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение

Исследования распространенности изолятов со сниженной чувствительностью к гликопептидам в Европе в последнее время не проводились. По оценкам отдельных организаций распространенность **hVISA** составляет $\leq 2\%$ MRSA в Европе, а **VISA** – ниже 0,1% (1). Выявление **VRSA** не зарегистрировано на Европейском континенте (1), и крайне редко встречается в других частях мира (2). Распространенность **hVISA** может быть значительно выше в отдельных регионах (1), что в большинстве случаев связано с распространением клональных линий (2). Подавляющее большинство штаммов с повышенным значением МПК (**VISA**) или имеющих резистентную субпопуляцию (**hVISA**) являются метициллинорезистентными.

Клиническое значение **hVISA** определить сложно, поскольку проспективные контролируемые исследования не проводились. Тем не менее, считается, что наличие фенотипа **hVISA** ухудшает прогноз терапии, по крайней мере, при серьезных инфекциях (2, 3). Поэтому при неэффективности терапии инфекций кровотока рекомендуется провести исследование с целью возможного выявления **hVISA**. В последнее время появляется все больше доказательств того, что наличие изолятов с МПК, находящейся в верхней части диапазона чувствительности (МПК >1 мг/л), ухудшает прогноз терапии и может приводить к повышению уровня летальности, по крайней мере, при инфекции кровотока (3-8). Возможная причина этих наблюдений остается неясной и может быть связана с недостаточной экспозицией ванкомицина (9,10). Кроме того, интерпретация результатов этих исследования осложняется из-за различных значений МПК, полученных при проведении разных методов (8, 9).

Механизм формирования **hVISA** является сложным. Выявление основано на методах популяционного анализа (11), что является довольно сложной процедурой, требующей специального оборудования и высокого уровня технических знаний. Методика выявления штаммов **hVISA** будет описана далее. В рамках эпидемиологического надзора следует ограничиваться определением **VISA** и **VRSA**, которые вместе определяются как изоляты с МПК >2 мг/л.

8.3 Механизм резистентности

Резистентность **VRSA** опосредуется геном *vanA*, экзогенно приобретенным от энтерококков. Резистентность изолятов как **VISA**, так и **hVISA** является эндогенной по своему характеру (т.е. возникающей в результате хромосомных мутаций) и характеризуется весьма сложным механизмом, в котором ни один из генов не играет ведущей роли. Фенотип **VISA/hVISA** связан с утолщением клеточной стенки бактерий вследствие гиперпродукции гликопептидсвязывающих мишеней. Несмотря на то, что в лабораторных условиях фенотип **hVISA** часто является неустойчивым, в условиях *in vivo* он может переходить в **VISA** (2).

8.4 Рекомендуемые методы выявления нечувствительных к ванкомицину штаммов *S. aureus*

Диско-диффузионный метод не может использоваться для выявления штаммов **hVISA** и **VISA**, но, вероятно, может быть использован для выявления штаммов **VRSA**, хотя количество исследований, доказывающих данное положение ограничено (12).

8.4.1 Определение МПК

Согласно рекомендациям EUCAST золотым стандартом определения МПК является метод микроразведений в бульоне (ISO 20776-1). Следует отметить, что МПК, установленная методом градиентной диффузии, может на 0,5-1 двукратное разведение превышать аналогичный параметр при определении чувствительности методом микроразведений в бульоне (8, 9). Пограничным значением ванкомицина, установленным EUCAST, для категории резистентности у *S. aureus* является МПК >2 мг/л. Изоляты с подтвержденным значением МПК >2 мг/л (согласно результатам метода микроразведений в бульоне) должны направляться в референтную лабораторию. Методы определения МПК не позволяют выявить штаммы **hVISA**.

8.4.2 Выявление **VRSA**, **VISA** и **hVISA**

Существующие методы обнаружения штаммов **hVISA** являются достаточно трудоемкими, и подразделяются на методы скрининга и подтверждения. Для проведения скрининга разработан ряд специализированных методов. Подтверждение проводится путем анализа популяционного профиля изолята на чашках с агаром с различными концентрациями ванкомицина (**PAP-AUC**) (11). Этот метод является технически сложным, не имеет большого опыта применения и, как следствие, используется в основном в референтных

лабораториях. Метод скрининга на агаре с ванкомицином и казеином (13), показал высокую чувствительность и специфичность, но до сих пор его оценка проводилась только в одном исследовании, что не позволяет включить данный метод в список рекомендованных. Оценка представленных ниже методов выявления штаммов VRSA и VISA была проведена в ходе многоцентровых исследований (14, 15).

A. Макроградиентный тест:

Данный тест позволяет судить о пониженной чувствительности к ванкомицину, но важно отметить, что считываемый результат не является МПК. Более того, данный тест не позволяет различать штаммы hVISA, VISA и VRSA. Тест должен выполняться в строгом соответствии с инструкцией производителя. Следует отметить также, что для данного исследования используется инокулюм большей плотности (2,0 по стандарту мутности МакФарланда), чем при стандартном методе градиентной диффузии и с использованием агара с сердечно-мозговым экстрактом (Brain Heart Infusion, BHI) вместо агара Мюллера-Хинтон. Кроме того, окончательный учет результатов проводится через 48 часов. Результат считается положительным, если полученное значение для ванкомицина и тейкопланина составляет ≥ 8 мг/л ИЛИ, если исследуется только тейкопланин – ≥ 12 мг/л.

Поскольку оба критерия предполагают использование тейкопланина, оценка активности ванкомицина может зависеть от результата тестирования тейкопланина. Следует руководствоваться следующим алгоритмом:

- Значение тейкопланина: ≥ 12 мг/л – VRSA, GISA или hVISA
- Значение тейкопланина 8 мг/л: – провести исследование с ванкомицином; если значение ванкомицина ≥ 8 мг/л – VRSA, GISA или hVISA
- значение тейкопланина < 8 мг/л – не VRSA, GISA или hVISA

B. Выявление резистентности к гликопептидам градиентным методом:

Исследование выполняется в соответствии с инструкциями производителя. Результат считается положительным, если значение ванкомицина и тейкопланина составляет ≥ 8 мг/л.

C. Скрининг на агаре с тейкопланином:

Для проведения данного исследования используется агар Мюллера-Хинтон, содержащий тейкопланин в концентрации 5 мг/л (14). Для приготовления суспензии исследуемой культуры в 0,9% физиологическом растворе

плотностью 2,0 по стандарту МакФарланда используется несколько колоний. На поверхность агара наносится 10 мкл инокулюма в виде отдельного пятна. Чашки инкубируются при температуре 35°C в обычной атмосфере в течение 24-48 часов. Рост колоний в течение 48 часов указывает на возможное снижение чувствительности к гликопептидам.

D. Тесты подтверждения hVISA/VISA:

Любой изолят со сниженной чувствительности по результатам скрининга и не являющийся VRSA или VISA при определении МПК, может являться hVISA. Такие изоляты могут быть исследованы методами популяционного анализа (PAP-AUC) (9), которые, как правило, выполняются в референтных лабораториях.

8.4.3 Контрольные штаммы

Некоторые возможные контрольные штаммы для фенотипических и генотипических методов исследования приведены ниже. Диапазоны допустимых значений для этих штаммов не установлены. При использовании коммерческих наборов следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 1. Примеры контрольных штаммов для контроля методов выявления резистентности к ванкомицину у *S. aureus*.

Штамм	Механизм
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Чувствительный к гликопептидам
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	hVISA (Mu3)
<i>S. aureus</i> ATCC 700699	VISA (Mu50)

8.5 Литература

1. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet*. 2013;382(9888):205.
2. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010;1: 99-139.
3. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54: 755-771.
4. Chang HJ, Hsu PC, Yang CC, Siu LK, Kuo AJ, et al. Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital based retrospective study. *J. Antimicrob Chemother* 2012, 67:736-41.
5. Honda H, Doern CD, Michael-Dunne W Jr, Warren DK. The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC Infect Dis*. 2011; 5:11:335.
6. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* bacteremia treated with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3315-20.
7. Rojas L, Bunsow E, Munoz P, Cercenado E, Rodrigueuz-Creixems, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. J. Antimicrob Chemother 2012; 7: 1760-8.
 8. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. Antimicrob Chemother. 2009; 64: 1024-8.
 9. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Howden BP, Johnson PD. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Apr;57(4):1654-63.
 10. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Johnson PD, Howden BP. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Clin Microbiol Infect. 2013 Dec;19(12):1163-8.
 11. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother. 2001; 47: 399-403.
 12. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:275-80.
 13. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. J Clin Microbiol. 2011; 49: 177–183.
 14. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol. 2007;45:329-32.
 15. Voss A, Mouton JW, van Elzakker EP, Hendrix RG, Goessens W, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (hGISA). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007;6:9.

9. Устойчивость *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* к ванкомицину

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Да
Важно для целей инфекционного контроля	Да
Важно для целей общественного здравоохранения	Да

9.1 Определение

Enterococcus faecium и *Enterococcus faecalis* считаются устойчивыми к ванкомицину (VRE) при МПК ванкомицина >4 мг/л.

9.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение

Энтерококки, особенно *E. faecium*, как правило, устойчивы к большей части имеющихся в клинической практике антимикробных препаратов. Лечение инфекций, вызванных ванкомицинорезистентными энтерококками (VRE), является сложной задачей в связи с ограниченным выбором возможных вариантов лечения. VRE, как правило, быстро распространяются и сохраняются во внутрибольничной среде, колонизируя сразу большое количество людей, из которых только у немногих развиваются энтерококковые инфекции (1, 2). Изоляты, обладающие VanB, обычно фенотипически чувствительны к тейкопанину. Описано два случая селекции устойчивости к тейкопанину в процессе терапии инфекции, вызванной энтерококками, несущими *vanB* ген (3, 4); а также четыре недавно описанных случая неэффективности терапии (5), свидетельствующих о том, что тейкопанин следует использовать с осторожностью в отношении энтерококков, обладающих геном *vanB*. В таблице 1 приведены типичные значения МПК штаммов, обладающих клинически наиболее важными ферментами группы Van.

Таблица 1. Типичные значения МПК энтерококков, экспрессирующих VanA или VanB.

Гликопептид	МПК (мг/л)	
	VanA	VanB
Ванкомицин	64-1024	4-1024
Тейкопанин	8-512	0,06-1

9.3 Механизм устойчивости

В большинстве случаев клинически значимая резистентность опосредуется плазмидо-кодированными VanA и VanB лигазами, заменяющими D-Ala(аланин) в пептидогликане на D-Lac(лактат). Эта замена приводит к уменьшению

связывания гликопептидов с мишенью. VanA-продуцирующие штаммы проявляют резистентность как к ванкомицину, так и к тейкопланину, тогда как штаммы, продуцирующие VanB, обычно остаются чувствительными к тейкопланину ввиду отсутствия индукции оперона резистентности. К другим менее распространенным ферментам Van-группы относятся VanD, VanE, VanG, VanL, VanM и VanN (6-9), хотя было показано значительное увеличение распространения VanM у *E. faecium* в Китае. (10).

Энтерококки других видов (*E. raffinosus*, *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*), могут иметь гены *vanA*, *vanB* или другие гены, кодирующие перечисленные выше ферменты, хотя такие штаммы и встречаются относительно редко. Хромосомно кодируемые VanC-ферменты были обнаружены у всех изолятов *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*. VanC обуславливает резистентность низкого уровня к ванкомицину (МПК = 4-16 мг/л), и, как правило, не считается важным с точки зрения инфекционного контроля (11).

Ванкомициновариабельные энтерококки – термин, который используется для VRE, когда экспрессия *van*-генов фенотипически не проявляется из-за генетических перестроек и может быть восстановлена под селективным давлением гликопептидов (12, 13). Кроме того, существует термин «VRE с низкой МПК», который используется для описания *vanB*-несущих изолятов, которые вследствие начальной слабой способности к индукции ванкомицином, характеризуются низким уровнем экспрессии генов *vanB*, вследствие чего их МПК ниже клинического пограничного значения. МПК таких штаммов (VRE с низкой МПК) может увеличиваться выше пограничного значения при длительной экспозиции ванкомицину (14). Как VRE, так и VRE с низкой МПК могут быть выявлены чаще всего только молекулярными методами. Их распространенность в различных географических регионах в настоящее время неизвестна.

9.4 Рекомендуемые методы выявления устойчивости *E. faecium* и *E. faecalis* к гликопептидам

Резистентность к ванкомицину может выявляться путем определения МПК, диско-диффузионным методом и методом пограничных концентраций на основе метода разведений в агаре. Для обнаружения изолятов с индуцибельной резистентностью при выполнении всех трех методов крайне важно соблюдать полную 24-часовую длительность инкубации.

Все три метода позволяют надежно выявлять резистентность, опосредованную геном *vanA*. В то же время, выявление *vanB*-опосредованной резистентности является более сложной задачей. Определение МПК методами разведений в агаре или бульоне не всегда позволяют выявить VanB (15-17). Опубликованные ранее отчеты свидетельствуют о том, что выявление *vanB*-опосредованной устойчивости с помощью автоматизированных систем также является проблематичным (18). Несмотря на имеющиеся обновленные данные о работе автоматизированных систем, современные данные, свидетельствующие об изменении эффективности выявления *vanB*-опосредованной резистентности, ограничены. Интерпретация результатов диско-диффузионного метода с использованием дисков, содержащих 5 мкг ванкомицина, может быть затруднительна, но при условии тщательного соблюдения рекомендаций EUCAST по учету приводит к получению надежных результатов (19).

При интерпретации результатов определения МПК или результатов диско-диффузионного метода важно убедиться, что изолят не является *E. gallinarum* или *E. casseliflavus*, которые могут быть ошибочно идентифицированы как *E. faecium* из-за положительного арабинозного теста. В данном контексте метод MALD-TOF масс-спектрометрии является очень полезным для идентификации энтерококков (20). При отсутствии оборудования для MALDI-TOF масс-спектрометрии можно использовать тест для выявления MGP (метил альфа-D-глюкопиранозида) или тест для выявления подвижности для дифференциации *E. gallinarum* / *E. casseliflavus* от *E. faecium* (MGP - отрицательный, неподвижный).

9.4.1 Определение МПК

Определение МПК может быть выполнено методами разведений в агаре, микроразведений в бульоне или градиентным методом.

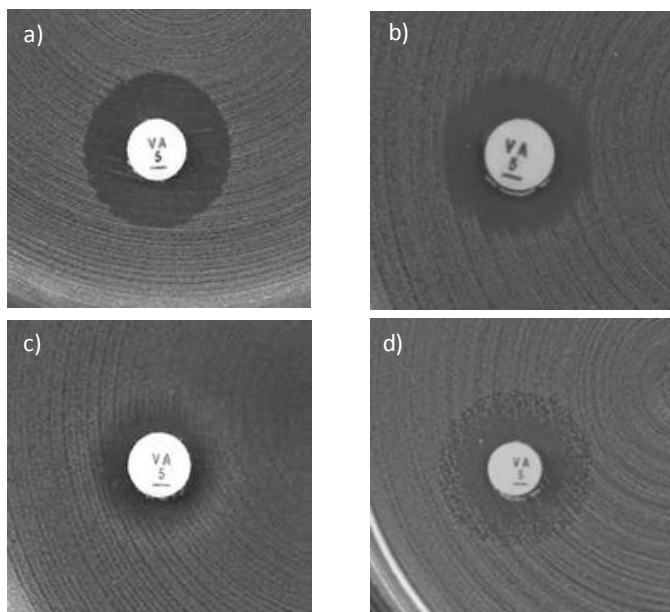
По рекомендациям EUCAST метод микроразведений выполняется в соответствии со стандартом ISO 20776-1.

9.4.2 Диско-диффузионный метод

Выполнять диско-диффузионный метод следует в строгом соответствии с рекомендациями EUCAST. Учет результатов проводится в проходящем свете, при этом следует тщательно оценить край зоны подавления роста (четкий или размытый) и/или наличие микроколоний внутри зоны. Четкий край зоны подавления роста свидетельствует о чувствительности изолята. Изолят с четким краем зоны подавления роста и диаметром, больше пограничного

значения, оценивается как чувствительный к ванкомицину. Изолят с размытым краем зоны подавления роста или колониями внутри зоны (Рисунок 1) может быть резистентным независимо от размера зоны и не должен оцениваться как чувствительный без подтверждения путем определения МПК. Результаты недавно выполненных многоцентровых исследований показали большую эффективность диско-диффузионного метода по сравнению с детекцией VanB-продуцирующих энтерококков с помощью VITEK2, особенно в лабораториях, имеющих опыт оценки размытых краев зоны (19). Диско-диффузионный метод выполняется в соответствии с методологией EUCAST для непривередливых бактерий. Для выявления индуцибельной резистентности у некоторых изолятов необходимо проведение инкубации в течение полных 24 часов.

Рисунок 1. Учет результатов определения чувствительности *Enterococcus* spp. к ванкомицину диско-диффузионным методом.



a) Четкий край зоны подавления роста, диаметр ≥ 12 мм. Изолят оценивается как чувствительный.

b-d) Размытый край и/или колонии внутри зоны. Изолят оценивается как устойчивый независимо от диаметра зоны.

9.4.3 Метод пограничных концентраций на основе метода разведений в агаре

Надежным методом обнаружения *vanA*- и *vanB*-положительных изолятов является метод пограничных концентраций с использованием агара на основе сердечно-мозгового экстракта (ВНІ), содержащего ванкомицин в концентрации 6 мг/л (19). Можно использовать чашки с агаром как приготовленные в лаборатории, так и доступные из коммерческих источников. Для выполнения исследования на чашки с ВНІ-агаром, содержащим 6 мкг/л ванкомицина, наносится 1×10^5 – 1×10^6 КОЕ (10 мкл суспензии плотностью 0,5 по стандарту

мутности МакФарланда). Чашки инкубируются в условиях обычной атмосферы при 35±1°C в течение 24 ч для выявления резистентности у некоторых изолятов с индуцибельной резистентностью. Рост более одной колонии оценивается как положительный результат исследования.

9.4.4 Генотипическое исследование

Определение резистентности ванкомицина с использованием ПЦР для выявления генов *vanA* и *vanB* может выполняться с использованием как in-house, так и коммерчески доступных методов (20-22).

9.4.5 Контроль качества

Некоторые возможные контрольные штаммы для фенотипических и генотипических методов исследования приведены ниже. Диапазоны допустимых значений для этих штаммов не установлены. При использовании коммерческих наборов следует использовать контрольные штаммы, указанные в инструкции производителя.

Таблица 2. Примеры контрольных штаммов для определения чувствительности энтерококков

Штамм	Механизм
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Чувствительный к ванкомицину
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Резистентный к ванкомицину (<i>vanB</i>)
<i>E. faecium</i> NCTC 12202	Резистентный к ванкомицину (<i>vanA</i>)

9.5 Литература

1. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008;9:567-71.
2. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:300-5.
3. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J Infect Dis.* 1993;167:1224-7.
4. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fielt J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the *vanB* phenotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4274-82.
5. Holmes NE, Ballard SA, Lam MM, Johnson PD, Grayson ML, Stinear TP, Howden BP. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(9):2134-9.
6. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5857-60.
7. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2667-72.
8. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4643-7.

9. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4606-12.
10. Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, et al. High Prevalence of vanM in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7795-8.
11. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36:119-24.
12. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Rønning TG, et al. A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4119-27.
13. Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1405-10.
14. Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, Grayson ML. Improved Detection of vanB2-Containing *Enterococcus faecium* with Vancomycin Susceptibility by Etest Using Oxgall Supplementation. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46; 1961-4.
15. Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, et al. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3019-21.
16. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:171-6.
17. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, Boehm J, Kay I, Flexman J, Coombs GW, Ingram PR. Low vancomycin MICs and fecal densities reduce the sensitivity of screening methods for vancomycin resistance in Enterococci. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2829-33.
18. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1998;36:592-4.
19. Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schønning K, et al. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1582-9.
20. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Özenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 3073-7
21. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1434.
22. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:1105-10.
23. Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert *vanA/vanB* molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31:273-6.

10. *Streptococcus pneumoniae*, нечувствительный к пенициллину (недикий тип)

Значение выявления механизма устойчивости	
Требуется для определения клинической категории чувствительности	Да
Важно для целей инфекционного контроля	Нет
Важно для общих целей общественного здравоохранения	Да

10.1 Определение

Изоляты *S. pneumoniae*, характеризующиеся пониженной чувствительностью к пенициллину (МПК >0,06 мг/л, т.е. > значения для изолятов дикого типа) ввиду присутствия модифицированных пенициллинсвязывающих белков (ПСБ) и более низким сродством к β -лактамам.

8.2 Клиническое и/или эпидемиологическое значение определения механизмов устойчивости

S. pneumoniae является наиболее частым возбудителем пневмонии, характеризующейся высоким уровнем заболеваемости и смертности во многих странах. Каждый год пневмококковые инфекции становятся причиной смерти примерно трех миллионов человек во всем мире. Нечувствительность *S. pneumoniae* низкого уровня к пенициллину является причиной повышенной смертности при лечении менингита бензилпенициллином (1). При других типах инфекции резистентность низкого уровня не приводит к повышению частоты летальных исходов при условии использования повышенных доз антибиотиков. Во многих странах разработаны и реализуются программы вакцинации против нескольких серотипов пневмококков, что также может влиять на уровень резистентности инвазивных изолятов (2). Несмотря на это, нечувствительные к пенициллину штаммы *S. pneumoniae* остаются основной клинической проблемой, важной с точки зрения общественного здравоохранения в целом, хотя данным микроорганизмам и не свойственно распространение в пределах лечебно-профилактических учреждений, в отличие от многих других описанных в этом документе возбудителей.

10.3 Механизм резистентности

У *S. pneumoniae* описано шесть ПСБ, из которых основной мишенью для пенициллина является ПСБ 2х (3). Наличие «мозаичных генов», кодирующих

низкоаффинные ПСБ, является результатом горизонтального переноса генов от комменсальных малопатогенных зеленающих стрептококков (3). Уровень устойчивости к β -лактамам зависит не только от присутствующих у изолята низкоаффинных мозаичных ПСБ, но и от модификации природных специфических ПСБ *S. pneumoniae* (4). Штаммы, имеющие МПК бензилпенициллина в диапазоне 0,12 – 2 мг/л, оцениваются как чувствительные к пенициллину при всех инфекциях, кроме менингита, при условии использования более высоких доз пенициллина; при менингитах – такие штаммы всегда должны оцениваться как резистентные (5).

10.4 Рекомендуемые методы выявления нечувствительности к пенициллину у *Streptococcus pneumoniae*

Нечувствительность к пенициллину может быть выявлена фенотипически при определении МПК или определении чувствительности диско-диффузионным методом.

10.4.1 Диско-диффузионный метод

Эффективным методом скрининга пневмококков недикого типа по чувствительности к пенициллину является диско-диффузионный метод с использованием диска, содержащего 1 мкг оксациллина (6-8). Данный метод характеризуется очень высокой чувствительностью, но низкой специфичностью, так как штаммы с диаметром зоны подавления роста ≤ 19 мм могут иметь переменную чувствительность к бензилпенициллину, и для всех изолятов недикого типа по результатам скрининга следует определять МПК бензилпенициллина (8).

Для других β -лактамов, кроме бензилпенициллина, диаметр зоны подавления роста вокруг диска с оксациллином, может использоваться в качестве предиктора чувствительности (см. Рисунок 1).

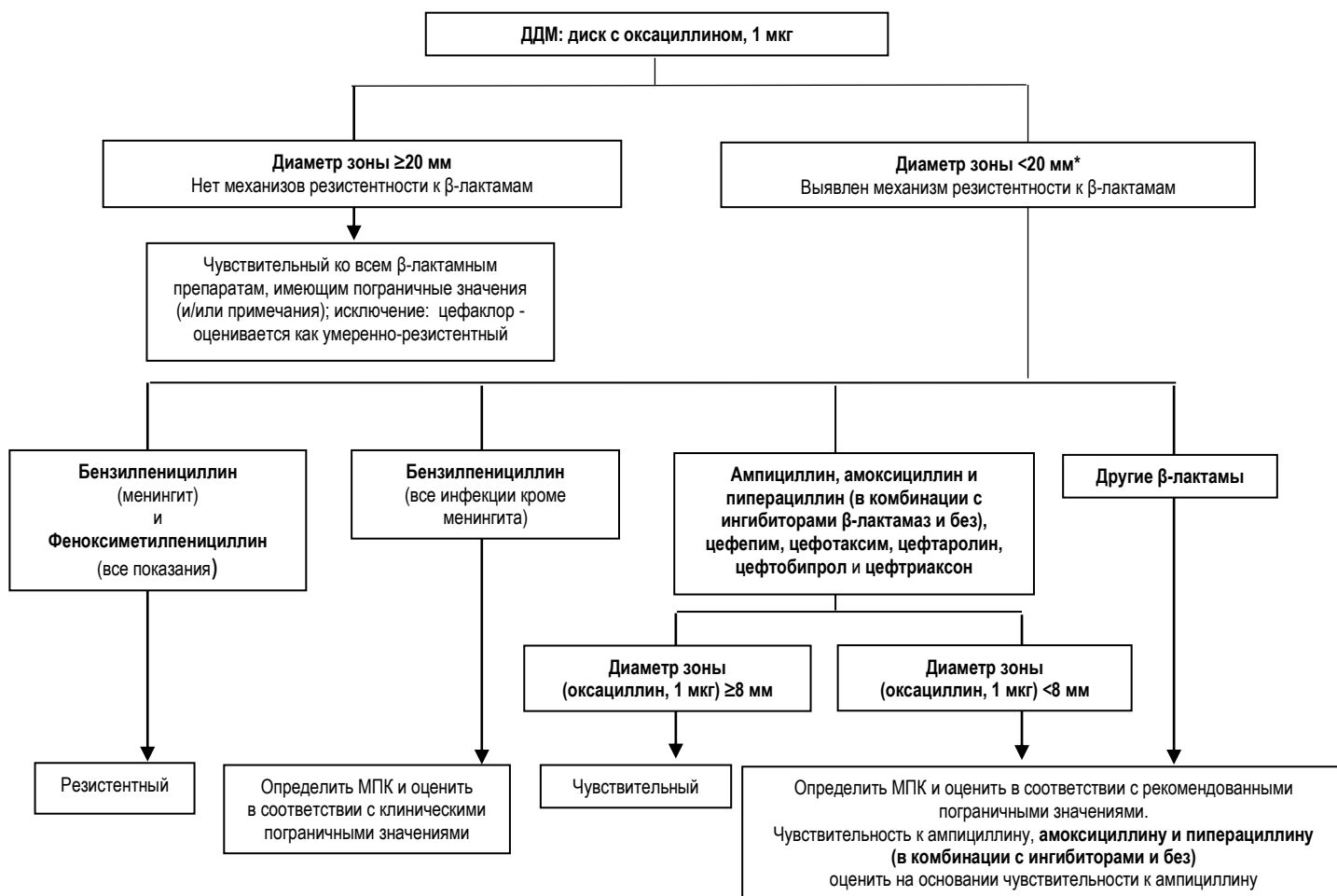


Рисунок 1. Скрининг резистентности к β-лактамам у *S. pneumoniae*

*Если диаметр зоны подавления роста вокруг диска с оксациллином, 1 мкг, <20 мм, всегда следует определять значение МПК бензилпенициллина; но нельзя задерживать ответ о чувствительности к другим β-лактамам согласно приведенной схеме, и результате определения чувствительности к бензилпенициллину при менингите.

10.4.2 Пограничные значения

Первоначально пограничные значения для пенициллина разрабатывались для оценки эффективности терапии пневмококковых менингитов. Со временем в ходе клинических исследований было выявлено, что исходы пневмококковой пневмонии, вызванной штаммами с повышенной МПК пенициллина и парентеральной терапией пенициллином, в большинстве случаев не отличались от исходов при лечении другими препаратами. Учитывая микробиологические, фармакокинетические и фармакодинамические данные, клинические пограничные значения для оценки чувствительности к бензилпенициллину при инфекциях, кроме менингита, были пересмотрены (4).

Современны пограничные значения, установленные EUCAST, приведены в таблице 1 и последней версии Таблиц пограничных значений EUCAST.

Таблица 1. Оценка чувствительности к бензилпенициллину при менингитах и других инфекциях.

Показания	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания
	Ч ≤	Р >	
Бензилпенициллин (при инфекциях, кроме менингита)	0,06	2	При пневмонии при дозировании 1,2 г х 4: чувствительные к бензилпенициллину - изоляты с МПК ≤0,5 мг/л. При пневмонии при дозировании 2,4 г х 4 или 1,2 г х 6: чувствительные к бензилпенициллину - изоляты с МПК ≤1 мг/л. При пневмонии при дозировании 2,4 г х 6: чувствительные к бензилпенициллину - изоляты с МПК ≤2 мг/л.
Бензилпенициллин (при менингите)	0,06	0,06	

10.4.3 Контроль качества

Возможные контрольные штаммы для фенотипических методов исследования приведены ниже.

Таблица 2. Пример контрольного штамма для определения чувствительности к бензилпенициллину.

Штамм	Механизм
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Мозаичный ПСБ, МПК бензилпенициллина – 0,5 мг/л

10.5 Литература

1. Kaplan SL, Mason EO Jr. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):628-44.
2. Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009;15 (Suppl 3):16-20.
3. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähner D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1999; 5: 91-99.
4. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 829-834.
5. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: Coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. Clin Infect Dis 2009; 48: 1596 – 1600.
6. Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. Can Med Assoc J 1977; 117: 1159-61.
7. Swenson JM, Hill BC, Thornsberrry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-52.
8. Jetté LP and C Sinave. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin- and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 1999; 37: 1178-81.