

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.11:579.252.55].083.1

Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Маянский Н.А.

### МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАРБАПЕНЕМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава РФ, 119991, Москва

*Pseudomonas aeruginosa* принадлежит к числу лидирующих оппортунистических патогенов. Оценка чувствительности госпитальных изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам является важным этапом в борьбе с синегнойной патологией. Цель работы – подтверждение диагностической эффективности масс-спектрометрического подхода для оценки карбапенемазной активности у клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Исследования были направлены на выявление карбапенемаз у 50 клинических изолятов *P. aeruginosa*, нечувствительных к карбапенемам (контрольная группа – 9 изолятов *P. aeruginosa*, чувствительных к карбапенемам). Проведено сравнение результатов, полученных посредством лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС) и при помощи известных методик – фенотипического определения наличия металло-бета-лактамаз (МБЛ) при помощи E-тестов и определения наличия генов карбапенемаз (VIM, IMP, NDM) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

У 14 (28%) из 50 нечувствительных к карбапенемам штаммов была выявлена МБЛ-активность, все они несли гены карбапенемаз VIM-типа. Гены *imp* и *ndm* не были найдены ни у одного штамма. Гены *vim* были найдены только у МБЛ-позитивных штаммов, МБЛ-активность регистрировалась только у носителей генов *vim*. По данным МАЛДИ-ВП МС все МБЛ- и VIM-позитивные штаммы демонстрировали повышенную способность гидролизовать меропенем. Процент гидролиза при тестировании данных штаммов составлял от 7,6 до 59,3. Отсутствие карбапенемазной активности демонстрировали 36 (72%) из 50 нечувствительных к карбапенемам штаммов с процентом гидролиза от 0 до 4. Ни один из 9 контрольных чувствительных к карбапенемам изолятов не обладал МБЛ-активностью, не был носителем исследованных генов карбапенемаз и не гидролизировал меропенем.

МАЛДИ-ВП МС является перспективным методом для использования в практике клинической микробиологии для выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемы, карбапенемазы, масс-спектрометрия.

**Для цитирования:** Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Маянский Н.А. Масс-спектрометрическая оценка карбапенемазной активности *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-99-105>

Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Mayansky N.A.

#### THE MASS-SPECTROMETRIC EVALUATION OF CARBAPENEMASE ACTIVITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

The Federal State Autonomous Institution "The National Scientific Practical Center of Children Health" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

*The Pseudomonas aeruginosa* is among number of leading opportunistic pathogens. The evaluation of sensitivity of hospital isolates of *P. aeruginosa* to antibiotics is an important stage in the struggle with *Pseudomonas sepsis* pathology.

The purpose of study is to confirm diagnostic efficiency of mass spectrometry approach in evaluation of carbapenemase activity in clinical isolates of *P. aeruginosa*. The study was targeted to detection of carbapenemases in 50 clinical isolates of *P. aeruginosa*, non-sensitive to carbapenemas (control group - 9 isolates of *P. aeruginosa* sensitive to carbapenemas). The comparative analysis was implemented concerning the results obtained using laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and using such common techniques as phenotype detection of presence of metallo-beta-lactamase using E-tests and detection of presence of genes of carbapenemases (VIM, IMP, NDM) using polymerase chain reaction in real-time.

The metallo-beta-lactamase activity was established in 14 (28%) out of 50 non-sensitive to carbapenemas strains. All of them had genes of carbapenemases VIM-type. No IMP and NDM genes were detected in any strain. The VIM genes were detected only in metallo-beta-lactamase positive strains and metallo-beta-lactamase activity was registered only in carriers of VIM genes. According data of MALDI-TOF, all metallo-beta-lactamase and VIM positive strains demonstrated increased capacity of hydrolyzing meropenem. The percentage of hydrolysis under testing of the given strains made up to from 7.6 to 59.3. The absence of carbapenemase activity was demonstrated by 36 (72%) out of 50 strains non-sensitive to carbapenemas with percentage of hydrolysis from 0 to 4. None of 9 control isolates sensitive to carbapenemas had metallo-beta-lactamase activity, carried analyzed genes of carbapenemas and hydrolyzed meropenem. The MALDI-TOF mass spectrometry is a perspective technique to be applied in practice of clinical microbiology for detect isolates of *P. aeruginosa*, producing carbapenemases.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenemas; carbapenems; mass spectrometry.

**For citation:** Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Mayansky N.A. The mass-spectrometric evaluation of carbapenemase activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2018; 63(2): 99-105. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-99-105>

**For correspondence:** Chebotar I.V., doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of microbiology, e-mail: [nizamnn@yandex.ru](mailto:nizamnn@yandex.ru)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 29.09.2017  
Accepted 18.10.2017

**Введение.** Угроза, исходящая от одного из главных оппортунистических возбудителей, *Pseudomonas aeruginosa*, обусловлена не только его мощным патогенетическим потенциалом [1]. Госпитальные штаммы *P. aeruginosa* обладают исключительной способностью приобретать резистентность к разным группам антибиотиков, включая такие высокоэффективные препараты, как карбапенемы [2]. Одним из основных механизмов формирования карбапенемрезистентности *P. aeruginosa* является ферментативная инактивация антибиотика с помощью особых бета-лактамаз – карбапенемаз. Карбапенемазы – ферменты, которые гидролизуют пенициллины, карбапенемы и в различной степени цефалоспорины и монобактамы [3].

Согласно мировой статистике, до 40% карбапенеморезистентных штаммов *P. aeruginosa* являются продуцентами карбапенемаз [4, 5]. У *P. aeruginosa* чаще встречаются карбапенемазы IMP, VIM, NDM, относящиеся к металло-бета-лактамазам (МБЛ) [6, 7]. В России в 2013–2014 гг. МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* составили 21,3% [8]. В странах СНГ – России, Беларуси и Казахстане – МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* продуцируют карбапенемазу VIM-2 (99,6 %), реже (0,4 % штаммов) несут IMP-карбапенемазу [9]. Выявление штаммов-продуцентов карбапенемаз является крайне важным для клинической медицины, так как знание механизма резистентности даёт возможность для назначения адекватной антибиотикотерапии.

Подходы для детекции карбапенемаз можно условно разделить на генетические, фенотипические и аналитические [10]. Генетические подходы подразумевают выявление генов карбапенемаз с помощью различных видов ПЦР и секвенирования [11, 12]. Они позволяют быстро и надёжно определить наличие генов карбапенемаз и их типовую принадлежность. Недостаток генетических методов заключается в том, что наличие гена не гарантирует экспрессии признака. Это доказывается рядом наблюдений, в которых бактерии, несущие ген карбапенемазы, фенотипически могут быть чувствительными к карбапенемам [13]. Фенотипические подходы (модифицированный тест Ходжа, СИМ-тест, МБЛ-Е-тест и др.) просты для выполнения, но требуют больше времени для получения результата. К сожалению, они не позволяют расшифровать тип карбапенемазы, а некоторые из них (модифицированный тест Ходжа и биохимическое определение карбапенемаз, выполняемое на баканализаторах) характеризуются большой вероятностью ошибки [14–16]. Аналитическая группа методов

включает в себя электрофокусирование, иммунохроматографию и способы, основанные на выявлении продуктов гидролиза карбапенемов (Carba NP-тест, УФ-спектрометрия и масс-спектрометрия) [17–19]. Весьма перспективной технологией оценки гидролиза карбапенемов является матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная время-пролетная масс-спектрометрия (МАЛДИ-ВП МС) [20]. Выявление продуцентов карбапенемаз с помощью масс-спектрометрии основано на оценке пиков, специфичных для нативных и гидролизированных форм карбапенемов после инкубации исследуемого штамма с антибиотиком. Известно большое число исследований по масс-спектрометрической детекции карбапенемаз энтеробактерий, которые показали хорошо воспроизводимые результаты [21, 22]. Более сложная ситуация складывается при выявлении карбапенемаз у *P. aeruginosa*. Разные авторские коллективы предлагают различные условия эксперимента, изменяя состав растворов, в которых происходит гидролиз, время реакции и даже тип матрицы для масс-спектрометрии [23–25]. Однако хорошо воспроизводимой методики так и не было предложено. Это говорит о необходимости оптимизации MS-технологии выявления карбапенемаз у *P. aeruginosa* для создания чувствительного, специфического, хорошо воспроизводимого и простого в исполнении метода.

Цель настоящей работы – подтверждение диагностической эффективности масс-спектрометрического подхода для оценки карбапенемазной активности у клинических изолятов *P. aeruginosa*.

**Материал и методы.** Для исследования были использованы штаммы *P. aeruginosa* из коллекции лаборатории микробиологии ФГАУ «ННПЦЗД» Минздрава России, собранной в 2012–2015 гг. Штаммы были выделены от пациентов по принципу «один пациент – один (первый по времени) изолят». Критерием включения в исследование была нечувствительность (резистентность или промежуточная чувствительность) хотя бы к одному из тестируемых карбапенемов – меропенему и имипенему. Оценка чувствительности каждого штамма проведена при помощи E-тестов в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (Bio-Rad). Было отобрано 50 штаммов, для которых минимальная подавляющая концентрация (МПК) была > 2 мг/л для меропенема и > 4 мг/л для имипенема. Интерпретация чувствительности соответствовала критериям Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (The European Commit-

tee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) и национальным клиническим рекомендациям [26, 27]. Для контроля были использованы 8 чувствительных к карбапенемам госпитальных штаммов (МПК меропенема  $\leq 2$  мг/л, имипенема  $\leq 4$  мг/л), отобранных из коллекции по принципу случайной выборки, и один референс-штамм ATCC 27853. Штаммы были изолированы из образцов, полученных в ходе проведения плановых диагностических процедур, предусмотренных локальными стандартными протоколами. Видовая идентификация выполнена на основе рутинных микробиологических методов и МАЛДИ-ВП МС с помощью прибора Microflex и программного обеспечения MALDI Biotyper RTC 3.1 (Bruker Corp.).

Наличие генов карбапенемаз VIM, IMP и NDM определяли при помощи коммерческих наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Для фенотипического выявления наличия МБЛ проведен МБЛ-Е-тест в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (BioMérieux). Наличие МБЛ считалось установленным в случае 8-кратного уменьшения МПК имипенема на секторе тест-полоски, содержащем ингибитор МБЛ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Для определения наличия карбапенемаз с помощью МАЛДИ-ВП МС использовали суточную культуру *P. aeruginosa*, выращенную на агаре Мюллера-Хинтона. Материал, собранный бактериологической петлей (1 мкл) из одной колонии (диаметр 1,5–3,0 мм), добавляли к 0,2 мл базового раствора (фосфатный буфер, pH 7,2; ZnCl<sub>2</sub> (0,01 мг/мл); меропенем (1 мг/мл)), тщательно вортиксовали. Процедуру повторяли с тремя колониями данного изолята. Раствор с тестируемым штаммом и антибиотиком инкубировали при 37°C в течение 3 ч при встряхивании (240 колебаний в минуту), после чего останавливали реакцию добавлением эквивалентного объема ацетонитрила. В качестве негативного контроля использовали 0,2 мл базового раствора меропенема без добавления бактерий. Затем раствор центрифугировали, надосадочную жидкость помещали на мишень. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (ДНВ – от англ. 2,5-dihydroxybenzoic Acid) в концентрации 10 мг/мл в 50% растворе метанола. Спектры снимали на приборе Microflex (Bruker) в диапазоне 100–1000 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.3 (Bruker). Учитывали значения интенсивности пиков нативного антибиотика, m/z = 384, 406, 428, и пиков продуктов его гидролиза – m/z = 358, 380. Процент гидролиза рассчитывали по формуле:

$$ПГ = \frac{ППГ}{(ППГ + ПНА)} \times 100 - ПГНК,$$

где ПГ – процент гидролиза, ППГ – сумма интенсивностей пиков продуктов гидролиза, ПНА – сумма интенсивностей пиков нативного антибиотика, ПГНК – процент гидролиза в негативном контроле (базовый

**Характеристика нечувствительных к карбапенему изолятов *P. aeruginosa* в зависимости от отношения к гидролизу меропенема**

Характеристика	Гидролиз-положительные штаммы (n = 14)	Гидролиз-негативные штаммы (n = 36)
МБЛ-положительные	14/14	0/36
VIM-положительные	14/14	0/36
Диапазон гидролиза, %	7,6–59,3	0–4
Медиана гидролиза (25; 75 перцентиль),%	12 (11; 15,5)	0 (0; 1,3)

раствор меропенема без бактерий).

Все эксперименты повторялись трижды. Статистическую обработку результатов, отражающих гидролиз меропенема, проводили при использовании программного пакета Statistica 6.0.

**Результаты.** МБЛ-Е-тест выявил наличие МБЛ у 14 изолятов (МБЛ-положительные изоляты), что составило 28% от всех чувствительных к карбапенему штаммов (см. таблицу). Все МБЛ-положительные изоляты несли ген карбапенемазы из группы VIM (VIM-положительные изоляты). Гены *imp* и *ndm* не были найдены ни у одного штамма. У остальных 36 нечувствительных к карбапенему МБЛ-негативных штаммов не было обнаружено генов карбапенемаз (см. таблицу). Все чувствительные штаммы из контрольной группы (n = 9) показали отрицательные результаты в тестах на МБЛ и не несли генов *vim*, *imp* и *ndm*.

Процент гидролиза меропенема при тестировании всей выборки штаммов при помощи МАЛДИ-ВП МС составил от 0 до 59,3% и значимо различался (p < 0,001) между группами МБЛ/VIM-положительных и МБЛ/VIM-негативных изолятов (рис. 1; см. таблицу).

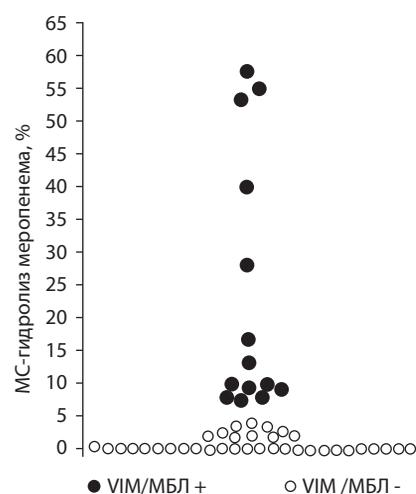


Рис. 1. Гидролиз меропенема в присутствии нечувствительных к карбапенемам изолятов *P. aeruginosa*, несущих МБЛ и vim-ген (черные круги) и не обладающих МБЛ и vim (белые круги).

По оси ординат – относительная интенсивность гидролиза, рассчитанная по специальному алгоритму (см. текст).

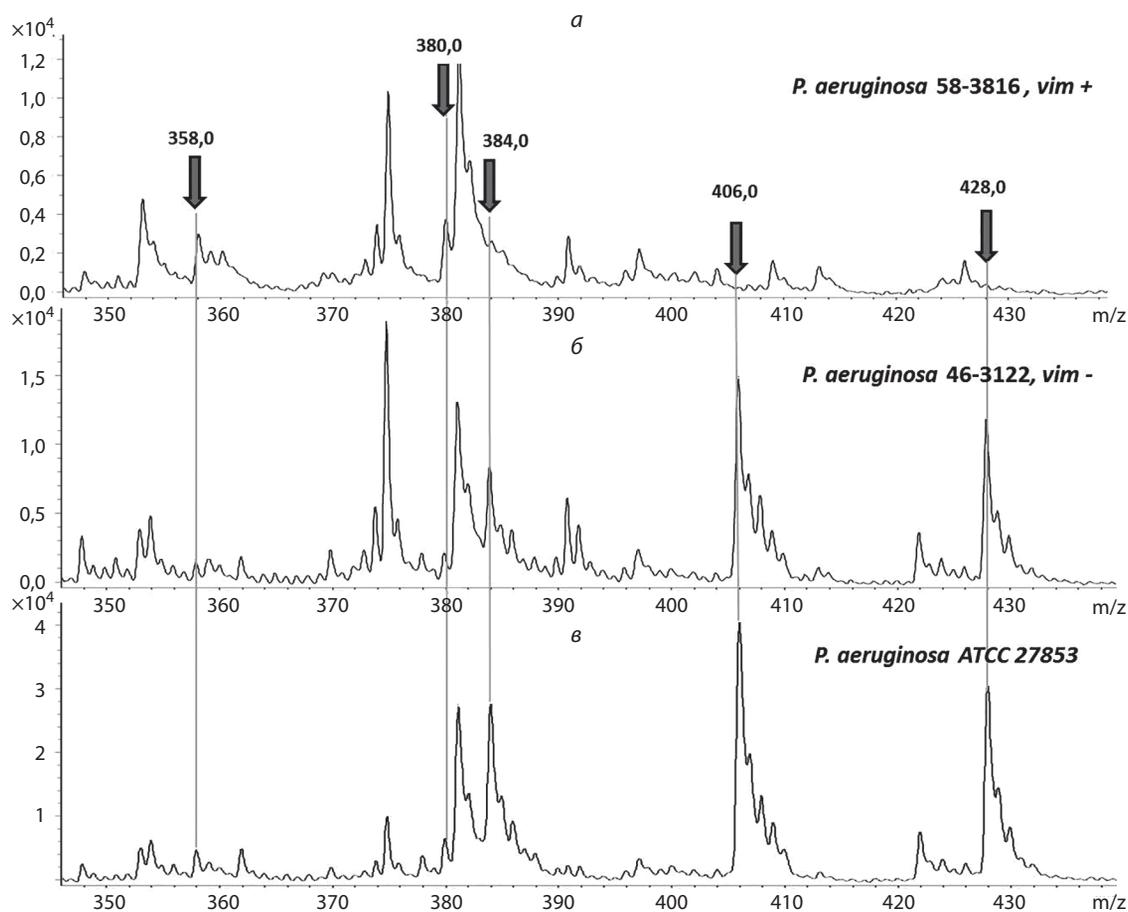


Рис. 2. Масс-спектры: *а* – резистентного к карбапенему гидролиз-положительного и МБЛ/VIM-положительного штамма *P. aeruginosa* 58-3816; *б* – резистентного к карбапенему гидролиз-негативного и МБЛ/VIM-негативного штамма *P. aeruginosa* 46-3122; *в* – чувствительного референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

По оси абсцисс – отношение массы ионизированных пептидов к их заряду ( $m/z$ ) в диапазоне 346–440; по оси ординат – интенсивность пиков. Стрелками обозначены масс-пики продуктов гидролиза меропенема ( $m/z = 358, 380$ ) и масс-пики нативного меропенема ( $m/z = 384, 406, 428$ ).

В первой группе процент гидролиза колебался в диапазоне 7,6–59,3 (см. таблицу). Типовая картина масс-спектров МБЛ/VIM-положительных штаммов характеризовалась снижением пиков нативного меропенема ( $m/z = 384, 406, 428$ ) и появлением пиков гидролизованного меропенема ( $m/z = 358, 380$ ) (рис. 2, *а*), что свидетельствовало об их выраженной меропенем-гидролизующей активности (гидролиз-положительные изоляты).

В группе МБЛ/VIM-негативных нечувствительных к карбапенемам штаммов процент гидролиза меропенема не превышал 4 (см. таблицу и рис. 1). Масс-спектрограммы этих штаммов отличались наличием высоких пиков нативного меропенема ( $m/z = 384, 406, 428$ ) и отсутствием (или малой интенсивностью) пиков гидролизованного меропенема (рис. 2, *б*), что дало повод отнести их в разряд гидролиз-негативных штаммов. Ни один из контрольных чувствительных к карбапенемам изолятов не проявлял карбапенемазной активности: процент гидролиза также находился в диапазоне 0–4,0, они не демонстрировали снижения интенсивности пиков нативного меропенема и увели-

чения пиков гидролиза меропенема (рис. 2, *в*). Между максимальными показателями гидролиза меропенема (4,0%) у МБЛ/VIM-негативных изолятов и минимальными значениями (7,6%) у МБЛ/VIM-положительных штаммов регистрировался разрыв (см. рис. 1).

*Обсуждение.* Хотя масс-спектрометрия и признана надёжным инструментом для детекции бета-лактамаз у отдельных групп бактерий, её эффективность для определения карбапенемаз у *P. aeruginosa* до настоящего времени оставалась под сомнением. Некоторые методики, успешные для исследования энтеробактерий, оказываются неподходящими для тестирования *P. aeruginosa*. Примером этого является масс-спектрометрическая оценка карбапенемаз в работе A. Johansson и соавт., которые использовали эртапенем в качестве индикаторного карбапенема, а  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту – в качестве матрицы. С помощью этой методики были безошибочно выявлены все изоляты *K. pneumoniae*, продуцировавшие карбапенемазы KPC, VIM и NDM [24]. Использование предлагаемого метода для изучения *P. aeruginosa* не дало удовлетворительных резуль-

татов: лишь у 6 из 11 VIM-продуцирующих изолятов были получены положительные ответы [24]. Следовательно, для оптимизации методики МС-оценки карбапенемазной активности *P. aeruginosa* требуется дополнительный подбор условий анализа, касающийся антибиотика-индикатора и его концентрации, времени инкубации и выбора матрицы для МАЛДИ-ВП МС.

В настоящей работе мы оптимизировали МС-детекцию карбапенемазной активности у *P. aeruginosa*, объединив методику J. Hrabak и соавт. и статистическую обработку результатов С. Monteferrante и соавт. [23, 28]. В первой из этих работ было установлено, что оптимальным антибиотиком-индикатором карбапенемзависимого гидролиза для *P. aeruginosa* является меропенем, а оптимальной матрицей – ДНВ. Выбор матрицы связан с тем, что целевые пики нативного меропенема и продуктов его гидролиза скрываются шумами, создаваемыми сигналами стандартной матрицы для масс-спектрометрии –  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Матрица ДНВ не создает шумов, критично маскирующих целевые пики. Однако, как установили авторы метода, при данных условиях возникают единичные случаи ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Следовательно, учёт наличия/отсутствия сигналов нативного антибиотика и продуктов его гидролиза не позволяет правильно оценить карбапенемазную активность тестируемых штаммов, требуя дополнительной статистической обработки сигналов. Такая обработка была предложена С. Monteferrante и соавт. для оценки бета-лактамазной активности энтеробактерий [28].

Исследования, проведённые в соответствии с нашей методикой, показали полное соответствие результатов оценки карбапенемазной активности *P. aeruginosa*, полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС и посредством традиционных методов. Гидролитическую активность в отношении меропенема демонстрировали те же штаммы (28%), у которых были детектированы МБЛ и найдены *vim*-гены. Ни у одного гидролиз-негативного штамма не выявлены гены карбапенемаз, по результатам МБЛ-Е-теста они также не проявляли карбапенемазной активности. Полученные данные логично подтверждают друг друга. VIM-карбапенемаза принадлежит к группе МБЛ (В класс по классификации Ambler) и лидирует по распространённости в России [8]. Металло-бета-лактамазы, и VIM в том числе, реализуют наиболее выраженный гидролиз карбапенемов, что нашло отражение в полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС результатах: процент гидролиза меропенема у некоторых МБЛ- и VIM-позитивных штаммов за 3 ч приближался к 60. Ни у одного из МБЛ- и VIM-позитивных изолятов процент гидролиза не опустился ниже 7.

Наличие разрыва между максимальными и минимальными показателями гидролиза меропенема у гидролиз-негативных и гидролиз-позитивных изолятов позволяет обозначить линию разделения cut-off, которая будет соответствовать 5% гидролизу и станет

диагностическим критерием при определении карбапенемазной активности у исследуемого штамма.

Интересно, что полученные результаты говорят о том, что всего 28% нечувствительных к карбапенемам штаммов являются продуцентами карбапенемаз. По-видимому, остальные 72% изолятов устойчивы к карбапенемам за счёт альтернативных механизмов резистентности, связанных с нарушением транспорта антибиотика внутрь бактерии (дефект поринов) либо с усилением его выведения из клетки во внешнюю среду (активация эффлюксомпы) [29]. Эти данные соответствуют результатам, полученным зарубежными авторами, которые детектировали МБЛ-карбапенемазы лишь у 6,4% нечувствительных к имипенему и у 31,8% резистентных к меропенему изолятов *P. aeruginosa* [30].

Мы не исключаем возможность дальнейшей модификации методик МС-оценки механизмов чувствительности, но уверены в том, что в обозримом будущем МС-технологии станут рутинными в области изучения резистентности бактерий.

**Заключение.** На сегодняшний день существует множество способов выявления микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз. Каждый из них обладает своими достоинствами и недостатками. Генетические методы позволяют быстро и надёжно определить наличие генов карбапенемаз и их типовую принадлежность, но не доказывают полноценной экспрессии этих генов. Фенотипические подходы экономичны и просты в выполнении, но требуют больше времени для получения результата. Метод МАЛДИ-ВП МС позволяет быстро и экономически эффективно выявлять продуценты карбапенемаз, но существующие протоколы не подходят для некоторых видов микроорганизмов, в том числе для *P. aeruginosa*. Проведённое исследование демонстрирует, что предложенная модификация протокола детекции карбапенемазной активности с помощью МАЛДИ-ВП МС позволяет достоверно выявлять продуценты карбапенемаз среди изолятов *P. aeruginosa*: результаты МС-анализа полностью совпадают с результатами генетического и фенотипического анализа. Следовательно, МАЛДИ-ВП МС является перспективным методом для выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы, в практике клинической микробиологии.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(3): 170-86.
2. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4): 582–610.

3. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/). (дата обращения: сентябрь 2017 г.)
4. Rizek C., Fu L., Dos Santos L.C., Leite G., Ramos J., Rossi F. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 13: 43.
5. Sedighi M., Vaez H., Moghoofoeie M., Hadifar S., Oryan G., Faghri J. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2015; 4: 57.
6. Al Bayssari C., Diene S.M., Loucif L., Gupta S.K., Dabboussi F., Mallat H. et al. Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4966-70.
7. Paul D., Dhar D., Maurya A.P., Mishra S., Sharma G.D., Chakravarty A. et al. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2016; 15: 31.
8. Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микогина А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов П.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2017; 19(1): 37-41.
9. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10): 867-76.
10. Hammoudi D., Moubareck C.A., Sarkis D.K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 107: 106-18.
11. Poirel L., Walsh T.R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70(1): 119-23.
12. Bogaerts P., Bebrone C., Huang T.D., Bouchahrouf W., Degheldre Y., Deplano A. et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(6): 3283-7.
13. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C.G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V., European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): 432-8.
14. Cohen Stuart J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(3): 205-10.
15. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., Leanord A., Keane C. et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2999–3002.
16. Sng W., Kim H., Kim H.S., Shin D.H., Shin S. et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Ann. Clin. Microbiol.* 2016; 19(4): 83-87.
17. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 1975; 88(1): 169-78.
18. Kitao T., Miyoshi-Akiyama T., Tanaka M., Narahara K., Shimojima M., Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 87(3): 330-7.
19. Bernabeu S., Poirel L., Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74(1): 88-90.
20. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(4): 249-56.
21. Knox J., Jadhav S., Seviour D., Agyekum A., Whipp M., Waring L. et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 4075–7.
22. Lasserre C., De Saint Martin L., Cuzon G., Bogaerts P., Lamar E., Glupczynski Y. 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.
23. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(9): 3222–7.
24. Johansson A., Ekelof J., Giske C., Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 89.
25. Hoyos-Mallecot Y., Cabrera-Alvargonzalez J.J., Miranda-Casas C., Rojo-Martin M.D., Liebana-Martos C., Navarro-Mari J.M. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58(4): 325-9.
26. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints). (дата обращения: Сентябрь 2017 г.)
27. Данные с сайта Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>. (дата обращения: сентябрь 2017 г.)
28. Monteferrante C.G., Sultan S., Ten Kate M.T., Dekker L.J., Sparbier K., Peer M. et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10): 2856-67.
29. Wolter D.J., Lister P.D. Mechanisms of  $\beta$ -lactam Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Pharmaceutical Design.* 2013; 19: 209-22.
30. Fournier D., Richardot C., Müller E., Robert-Nicoud M., Llanes C., Plesiat P. et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(8): 1772-80.

## REFERENCES

1. Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskij N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and pathology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya.* 2015; 17(3): 170-86. (in Russian)
2. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4): 582–610.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/) (accessed September 2017)

4. Rizek C., Fu L., Dos Santos L.C., Leite G., Ramos J., Rossi F. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 13: 43.
5. Sedighi M., Vaez H., Moghoofoeie M., Hadifar S., Oryan G., Faghri J. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2015; 4: 57.
6. Al Bayssari C., Diene S.M., Loucif L., Gupta S.K., Dabboussi F., Mallat H. et al. Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4966-70.
7. Paul D., Dhar D., Maurya A.P., Mishra S., Sharma G.D., Chakravarty A. et al. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2016; 15: 31.
8. Ejdel'shtejn M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Shek E.A., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. and «MARAFON» study group. Antibiotic resistance of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Russian hospitals: results of a multicentre epidemiological study "MARAFON" in 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya.* 2017; 19(1): 37-41. (in Russian)
9. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10): 867-76.
10. Hammoudi D., Moubareck C.A., Sarkis D.K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 107: 106-18.
11. Poirel L., Walsh T.R., Cuveillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70(1): 119-23.
12. Bogaerts P., Bebrone C., Huang T.D., Bouchahrouf W., Degheldre Y., Deplano A. et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(6): 3283-7.
13. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C.G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V., European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): 432-8.
14. Cohen Stuart J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(3): 205-10.
15. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., Leanord A., Keane C. et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2999-3002.
16. Sng W., Kim H., Kim J., Kim H.S., Shin D.H., Shin S. et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Ann. Clin. Microbiol.* 2016; 19(4): 83-7.
17. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 1975; 88(1): 169-78.
18. Kitao T., Miyoshi-Akiyama T., Tanaka M., Narahara K., Shimojima M., Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 87(3): 330-7.
19. Bernabeu S., Poirel L., Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74(1): 88-90.
20. Bocharova J.A., Chebotar' I.V., Mayanskij N.A. Possibilities, problems and prospects of mass-spectrometric technologies in medical microbiology (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(4): 249-56. (in Russian)
21. Knox J., Jadhav S., Seviour D., Agyekum A., Whipp M., Waring L. et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 4075-7.
23. Lasserre C., De Saint Martin L., Cuzon G., Bogaerts P., Lamar E., Glupczynski Y. 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.
22. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(9): 3222-7.
23. Johansson A., Ekelof J., Giske C., Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 89.
24. Hoyos-Mallecot Y., Cabrera-Alvargonzalez J.J., Miranda-Casas C., Rojo-Martin M.D., Liebana-Martos C., Navarro-Mari J.M. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58(4): 325-9.
25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (accessed September 2017)
26. The Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC). Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/> (accessed September 2017). (in Russian)
27. Monteferrante C.G., Sultan S., Ten Kate M.T., Dekker L.J., Sparbier K., Peer M. et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10): 2856-67.
28. Wolter D.J., Lister P.D. Mechanisms of  $\beta$ -lactam Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Pharmaceutical Design.* 2013; 19: 209-22.
29. Fournier D., Richardot C., Müller E., Robert-Nicoud M., Llanes C., Plesiat P. et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(8): 1772-80.