## ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
## ORIGINAL ARTICLES

# ДЕТЕКЦИЯ НА ПРОДУЦЕНТИ НА КАРБАПЕНЕМАЗИ СРЕД КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ФЕНОТИПНИ МЕТОДИ

**Т. Стоева[1], Р. Марковска[2], М. Божкова[1], Д. Димитрова[1], К. Божкова[1] и И. Митов[2]**

[1]Катедра по микробиология, МУ – Варна

[2] Катедра по медицинска микробиология, МУ – София

# DETECTION OF CARBAPENEMASE – PRODUCERS AMONG CLINICAL ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BY PHENOTYPIC METHODS

**T. Stoeva[1], R. Markovska[2], M. Bozhkova[1], D. Dimitrova[1], K. Bozhkova[1] and I. Mitov[2]**

[1]Department of Microbiology, Medical University – Varna

[2]Department of Medical Microbiology, Medical University – Sofia

**Резюме:**

**Цел:** Сравнително проучване на фенотипни методи за детекция на продуценти на карбапенемази, приложени върху клинични изолати *K. pneumoniae,* продуциращи карбапенемази, предварително охарактеризирани чрез молекулярногенетични методи. **Материал и методи:** Тествани бяха общо 46 карбапенем-резистентни изолата *K. pneumoniae*, продуценти на три типа карбапенемази: KPC-2 (n = 42), VIM-1 (n = 3) и OXA-48 (n = 1). Чувствителността на изолатите към imipenem и meropenem беше определена чрез дисково-дифузионен метод и чрез автоматизираната система Phoenix (BD), а резултатите – интерпретирани според препоръките на CLSI-2014. Извършени бяха следните фенотипни тестове за доказване продукция на карбапенемази: модифициран тест на Hodge, двойнодисков тест за синергизъм (ДДТС) с boronic acid, dipicolinic acid и EDTA и дискове imipenem и meropenem, както и комбиниран дисков метод (КДМ) с дискове ertapenem/cloxacillin и imipenem/cloxacillin, като резултатите бяха интерпретирани според препоръките на CLSI-2014 и EUCAST-2013. **Резултати:** Минималната потискаща концентрация (МПК) на imipenem и meropenem за тестваните изолати варираще между 4 mg/L и > 16 mg/L. Тестът на Hodge беше положителен при всички изолати. Двойнодисковите тестове за синергизъм с boronic acid, dipicolonic acid и EDTA идентифицираха всички KPC-2 и VIM-1 продуценти, но останаха негативни за OXA-48 продуциращия щам *K. pneumoniae.* При нито един от изолатите не се установи увеличаване на зоната на задръжка на бактериалния растеж с > 4 mm около дисковете ertapenem/cloxacillin и imipenem/cloxacillin в сравнение със зоните на задръжка около дисковете, натоварени само с ertapenem и imipenem. **Заключение:** Методът, базиращ се на инхибиране на карбапенем-хидролизиращи ензими от специфичен инхибитор (ДДТС, КДМ), е точен метод за идентификация на ензимите от класове A и B, но не и за клас D. В тези случаи в рутинната практика трябва да се разчита на модифицирания тест на Hodge за детекция на OXA-48 продуцентите. Комбинираното приложение на тестваните методи в рутинната лабораторна практика осигурява надеждна детекция на изолати *K. pneumoniae*, продуциращи различни типове карабапенемази.

**Ключови думи:** *K. pneumoniae*, карбапенемази, лабораторна детекция

***Адрес за кореспонденция:*** *Доц. д-р Теменуга Стоева, дм, Катедра по микробиология, МУ, ул. „Марин Дринов" № 55, 9002 Варна, e-mail: temenuga.stoeva@abv.bg*

**Summary:**

**Oblectives:** To evaluate two phenotypic tests for detection of different types of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, previously characterized by molecular-genetic methods. **Methods:** A total of 46 carbapenem resistant *K. pneumoniae* clinical isolates, producers of 3 types of carbapeneases were tested: KPC-2 (n = 42), VIM-1 (n = 3) and OXA-48 (n = 1). Susceptibility to imipenem and meropenem was determined by disc-diffusion method and Phoenix authomated system (BD). The results were interpreted according to current CLSI guidelines (2014). We performed the following phenotypic methods for carbapenemase detection: the modified Hodge test, the double disc synergy test (DDST) with boronic acid, dipicolinic acid, EDTA and discs imipenem and meropenem, as well as the combined-disc method (CDM) with discs ertapenem/cloxacillin and imipenem/cloxacillin. The results were interpreted according to CLSI-2014 and EUCAST-2013 guidelines. **Results:** MICs of imipenem and meropenem for the tested isolates varied between 4 mg/L and > 16 mg/L. All isolates demonstrated positive Hodge test. DDST with boronic acid, dipicolinic acid and EDTA identified all KPC-2 and VIM-1 producers, but not the single OXA-48 positive isolate of *K. pneumoniae.* No synergy of ertapenem and imipenem with cloxacillin (≥ 5 mm) was observed in any of the tested isolates. **Conclusion:** The method based on the inhibition of carbapenem-hydrolyzing enzymes by specific inhibitors (DDST, CDM) is accurate method for identification of class A and B enzymes, but not for class D enzymes. In these cases the modified Hodge test will ensure the detection of OXA-48 producers. Combined application of the evaluated methods in the diagnostic microbiological laboratory will provide reliable detection of *K. pneumoniae* isolates, producers of different types of carbapenemases.

**Key words:** *K. pneumoniae*, carbapenemases, laboratory detection

***Address for correspondence:*** *Assoc. Prof. Temenuga Stoeva, M. D., Department of Microbiology, Medical University, 55, Marin Drinov St., Bg – 9002 Varna, e-mail: temenuga.stoeva@abv.bg*

## ВЪВЕДЕНИЕ

*Klebsiella pneumoniae* е сред най-важните и проблемни за лечение вътреболнични патогени, особено в интензивните болнични структури. Причинява най-често инфекции на респираторния и уринарния тракт, инфекции на кръвта, като след *Escherichia coli* той е вторият най-чест причинител на този тип инфекции. *K. pneumoniae* се асоциира също и с възникване на трудно контролируеми вътреболнични епидемии. В последните десет години този бактериален вид се утвърждава като множествено-резистентен, причиняващ трудни за лечение инфекции. През 2013 г. делът на инвазивните изолати *K. pneumoniae* (от кръв и ликвор), продуценти на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs), демонстриращи множествена антибиотична резистентност, значително нараства, като за някои европейски страни (Румъния, България, Гърция, Латвия, Словакия, Полша) достига нива от 50-70% [8]. Карбапенемните антибиотици (imipenem, meropenem, ertapenem) са средството на избор за лечение на инфекции, причинени от ESBL-продуциращи *K. pneumoniae.* В последните години е налице тенденция в европейски и световен мащаб за поява и разпространение на щамове *K. pneumoniae*, демонстриращи резистентност и към тази стратегическа антибиотична група. В основата на механизма на резистентност стои продукцията на ензими, хидролизиращи карбапенемите (карбапенемази). Понастоящем възникването и разпространението на карбапенем-резистентни ентеробактерии, сред които и *K. pneumonia,* се приема като заплаха за общественото здраве. Инфекциите, причинени от такива микроорганизми, се асоциират със значителна смъртност – между 22% и 72% [3, 12], една от причините за което е ненавременната или липсваща ефективна антибиотична терапия.

Своевременната идентификацията на карбапенем-резистентни, карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae,* е от особено важно значение както за провеждане на адекватно лечение, така и за контрола на вътреболничните инфекции и свързаните с това епидемиологични проучвания. За идентификацията на тези микроорганизми определянето на минималната потис-

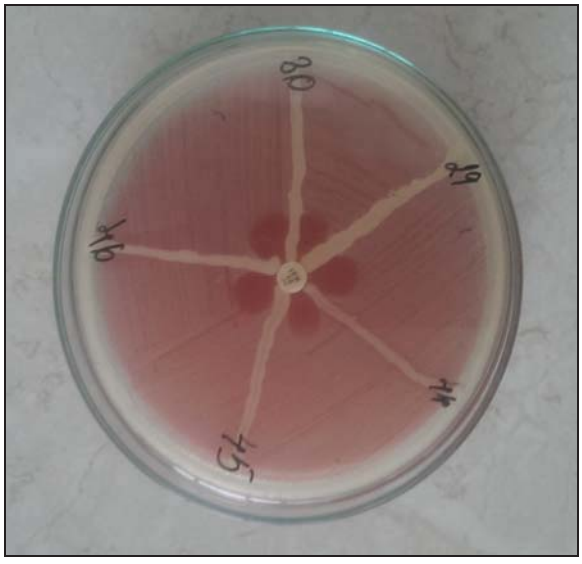
каща концентрация (МПК) не е достататъчно, тъй като често МПК на карбапенемите е в границите на чувствителността. Затова в практиката са въведени няколко фенотипни метода за детекция на карбапенемаза-продуциращи ентеробактерии, вкл. *K. pneumoniae*. Сред тях са модифицираният тест на Hodge, използването на хромогенни среди и химични вещества, които са инхибитори за различните класове бета-лактамази (карбапенемази). В това проучване представяме резултатите от сравнителното изпитване на два фенотипни метода, приложени върху изолати *K. pneumoniae* с предварително охарактеризирани чрез полимеразноверижна реакция (PCR) и секвениране карбапенемази [1, 14]: модифициран тест на Hodge, двойнодисков тест за синергизъм с boronic acid, dipicolinic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (ДДТС) и комбиниран дисков метод с cloxacillin (КДМ).

## Материал и методи

Общо 46 карбапенем-резистентни изолата *K. pneumoniae*, продуценти на три типа карбапенемази, бяха тествани: KPC-2 (n = 42), VIM-1 (n = 3), OXA-48 (n = 1) [1, 14]. Изолатите *K. pneumoniae*, продуценти на KPC-2, едновременно продуцираха и CTX-M-15 ESBL; VIM-1 изолатите – KPC-2 и TEM-1 бета-лактамаза, а единственият OXA-48-продуциращ изолат *K. pneumoniae* – CTX-M-14 ESBL. Проучваните щамове бяха изолирани последователно в периода март 2013-декември 2014 г. от хоспитализирани пациенти в различни клиники на МБАЛ "Св. Марина", предимно от интензивни и хирургични клиники. Чувствителността към imipenem и meropenem беше определена чрез дисково-дифузионния метод и чрез автоматизираната система Phoenix (BD), а резултатите – интерпретирани според препоръките на CLSI – 2014 [1, 5]. Извършени бяха следните фенотипни тестове за доказване продукция на карбапенемази: модифициран тест на Hodge, двойнодисков тест за синергизъм с дискове boronic acid, dipicolinic acid, EDTA и дискове imipenem, meropenem, поставени на разстояние 2 cm от център до център, както и комбиниран дисков метод с дискове ertapenem/cloxacillin, imipenem/cloxacillin и дискове, натоварени само с ertapenem и imipenem (Liofilchem s.r.l. – Italy). Резултатите от фенотипните тестове бяха интерпретирани според препоръките на CLSI и EUCAST [5, 9, 16]. Положителният тест на Hodge бе интерпретиран като индикатор за продукция на карбапенемаза; наличието на синергизъм между boronic acid и imipenem/meropenem – като индикатор за продукция на серин-зависима карбапенемаза (клас A, C), а синергизмът между boronic acid и meropenem/imipenem, заедно с увеличение на зоната на задръжка около дисковете ertapenem/cloxacillin или imipenem/cloxacillin ≥ 5 mm в сравнение със зоната около дисковете, натоварени само с ertapenem и imipenem – като индикатор за AmpC хиперпродукция. Синергизмът между imipenem/meropenem и dipicolinic acid/EDTA бе интерпретиран като инхибиране на метало-карбапенемаза.

## Резултати

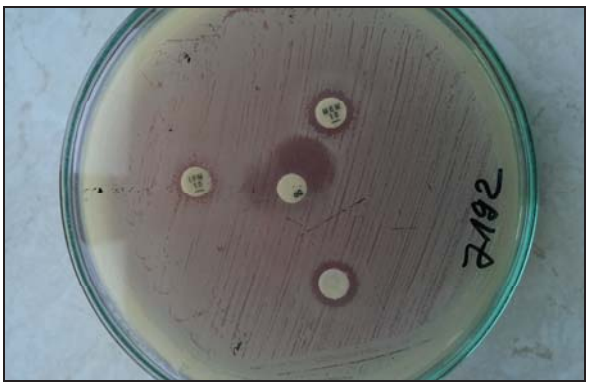
При всички изолати диаметърът на зоната на задръжка за imipenem и meropenem беше < 20 mm, а МПК на imipenem и meropenem вариране между 4 mg/L и > 16 mg/L. Модифицираният тест на Hodge беше положителен при всички тествани изолати (фиг. 1). Двойнодисковите тестове за синергизъм с boronic acid и dipicolinic acid идентифицираха всички KPC-2 (n = 42) и VIM-1 продуценти (n = 3), но останаха негативни за OXA-48 продуцента (фиг. 2 и 3). И трите изолата *K. pneumoniae*, продуценти на VIM-1, демонстрираха синергизъм между imipenem/meropenem и EDTA, като ефектът бе по-слабо проявен в сравнение с ефекта на синергизъм, демонстриран с dipicolinic acid. При нито един от изпитваните изолати не се установи потенциране с дисковете ertapenem/cloxacillin и imipenem/cloxacillin (увеличаване на зоната на задръжка с > 4 mm) в сравнение със зоната на задръжка около диска, съдържащ само ertapenem или imipenem.




**Фиг. 1. Положителен тест на Hodge:** растеж на карбапенем-чувствителния индикаторен щам *E. coli* ATCC25922 в областта на зоната на инокулация на изпитвания изолат *K. pneumoniae*, което води до деформация на зоната на задръжка около диска imipenem



**Фиг. 2. Ефект на синергизъм между дисковете imipenem и meropenem и диск, натоварен с boronic acid (разстояние от център до център 2 cm):** синергично разширяване на зоната на задръжка на бактериалния растеж около дисковете imipenem и meropenem, предизвикано от boronic acid като инхибитор на KPC-2 карбапенемазата, продуцирана от изпитвания изолат *K. pneumoniae*



**Фиг. 3. Ефект на синергизъм между дисковете imipenem и meropenem и диск, натоварен с dipicolinic acid (разстояние от център до център 2 cm):** просветляване на зоната (по-слаб или липсващ бактериален растеж) между дисковете imipenem и meropenem и диска, натоварен с dipicolinic acid, като резултат от инхибиращото действие на dipicolinic acid върху VIM-1 карбапенемазата, продуцирана от тествания изолат *K. pneumoniae*

## ОБСЪЖДАНЕ

*K. pneumoniae* е вторият по честота на изолиране бактериален вид от клинични материали в МБАЛ "Св. Марина" – Варна, в периода 2012-2014 г. и е сред първите два най-чести бактериални причинителя на септични състояния за същия период. През 2013-2014 г. делът на множественорезистентните (ESBLs) инвазивни изолати *K. pneumoniae* достигна 81% (непубликувани данни). В началото на 2012 г. бяха доказани и първите карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* [15]. В периода 2012-2014 г. относителният дял на тези изолати в болницата нарасна от единични изолати през 2012 г. до 9.2% през 2014 г., като в хода на епидемиологично проучване бе доказано вътреболнично разпространение на карбапенем-резистентен клон *K. pneumoniae* в няколко клиники на болницата [1].

Най-честият механизъм, медииращ резистентността на *K. pneumoniae* към карбапенемните антибиотици imipenem и meropenem, е продукцията на ензими от различни класове (A, B, D). Клинично най-важните ензими с карбапенемазна активност от клас A са KPC ензимите (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase) [19]. Идентифицирани са предимно в изолати *K. pneumoniae* и кодират високо ниво на резистентност не само към карбапенеми, но също и към повечето бета-лактами, включително широкоспектърните цефалоспорини. Първият KPC продуцент е KPC-2 изолат *K. pneumoniae*, доказан през 1996 г. в САЩ [27]. Понастоящем KPC-2 продуцентите са разпространени в световен мащаб и идентифицирани в много чревни бактериални видове, но най-често в *K. pneumoniae*. Гърция, Италия, Израел и страни от Латинска Америка (Колумбия, Аржентина) са ендемични региони за KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* [19].

Най-важните семейства карбапенемази от клас B ензими (метало-бета-лактамази, MBLs), идентифицирани в семейство *Enterobacteriaceae*, са IMP и VIM (Verona integron-encoded MBLs) ензимите, заедно с наскоро появилата се NDM група (New Delhi metallo beta lactamase). Гърция е ендемичен регион по отношение на VIM-1 продуциращи *Enterobacteriaceae*, като тази карбапенемаза е разпространена както в *K. pneumoniae*, така и в други видове от това семейство (*E. coli, C. freundii, M. morganii, Serratia spp., K. oxytoca*) [17, 24]. Понастоящем една от клинично най-значимите карбапенемази се отнася към този клас ензими – наскоро откритата NDM-1 в изолати *K. pneumoniae* и *E. coli* [20, 28]. Пакистан, Индия и Шри Ланка се приемат за резервоари на NDM продуциращи *Enterobacteriaceae*. Балканският регион, Арабският полуостров и Северна Африка също са важни източници на продуценти на този тип карбапенемаза [19].

Известни още като оксацилинази, карбапенем-хидролизиращите клас D бета-лактамази притежават слаба карбапенемазна активност и по правило не се асоциират с високо ниво на резистентност към карбапенеми. Оксацилиназите с карбапенемазна активност са характерни за *Acinetobacter baumannii*, но OXA-48 карбапенемазата и нейните деривати са идентифицирани в изолати от семейство *Enterobacteriaceae,* включително такива, причиняващи вътреболнични епидемии *(K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae)* [6, 26]. Турция и страни от Северна Африка са главни резервоари на тази карбапенемаза, но ензимът е доказан и в много европейски страни [23].

Коректната и навременна идентификация на специфичните механизми на карбапенемна ре-

зистентност сред *K. pneumoniae* е от особено важно значение за провеждане на адекватна антибиотична терапия в случаите на инфекция с този микроорганизъм, както и за предприемане на бързи мерки за контрол с цел предотвратяване дисеминацията на тези проблемни за терапия бактерии в болничната среда и свързаното с това развитие на вътреболнични инфекции и епидемии. Това прави необходимо микробиологичната лаборатория да е в състояние бързо да доказва продукцията на карбапенем-хидролизиращи ензими (като основен механизъм на резистентност) сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* и в частност *K. pneumoniae.* Трябва да се има предвид, че в много случаи, когато карбапенемазата е продуцирана самостоятелно (без комбинация с продукция на широкоспектърна бета-лактамаза, ESBL), МПК стойностите могат да са много ниски, дори в границите на чувствителността, особено по отношение на imipenem и meropenem. Наличие на карбапенемаза може да се подозира при стойности на МПК над 1 mg/L за imipenem или над 0.5 mg/L за ertapenem [20]. За доказването ù се използват различни фенотипни и молекулярногенетични методи. Модифицираният тест на Hodge намира широко приложение като фенотипен тест за детекция на карбапенемазна активност в неразрушената бактериална клетка. Този тест се базира на инактивацията на карбапенемния антибиотик (meropenem, ertapenem) от карбапенем-резистентен щам, което води до потенциране на растежа на карбапенем-чувствителния индикаторен щам *E. coli* в близост до meropenem/ertapenem-съдържащия диск по хода на линията на инокулация на тествания за карбапенемазна продукция щам. Понастоящем CLSI препоръчва модифицирания тест на Hodge като метод за детекция на карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae* [5]. Резултатите от проучването ни върху 46 карбапенем-резистентни изолата *K. pneumoniae* показват, че тестът на Hodge е чувствителен метод и може да докаже карбапенемазна активност в този бактериален вид. Нашите резултати са в унисон със съобщеното от C. Seah и колектив, които проучват 27 изолата *K. pneumoniae* с различни механизми на бета-лактамна резистентност [25]. В нашата колекция от изолати липсват такива, които да продуцират само ESBL или AmpC бета-лактамази и да имат намалена проницаемост на външната клетъчна мембрана, комбинация, за която някои автори съобщават, че се асоциира с фалшивоположителни резултати при модифицирания тест на Hodge поради слабата хидролиза на карбапенемния антибиотик от широкоспектърната бета-лактамаза (специално CTX-M) или AmpC ензима [4, 21, 22]. Други автори установяват фалшивоотрицателни резултати с теста на Hodge при NDM-1-продуциращи *Enterobacteriaceae* [10, 25]. Като се вземе под внимание фактът, че понастоящем NDM-1 бета-лактамазата е сред клинично най-значимите карбапенемази, продуцирани от семейство *Enterobacteriaceae* (в частност *K. pneumoniae* и *E. coli*), при използването на модифицирания тест на Hodge винаги трябва да се имат предвид тези ограничения на метода, особено в болнични структури с висока изолируемост на NDM продуценти. За ниска чувствителност на Hodge теста при MBL продуциращи *Enterobacteriaceae* съобщават D. Doyle и колектив, които установяват 98% и 93% чувствителност при детекция на KPC и OXA-48 продуценти, но едва 12% при детекция на MBL продуценти [7].

През 2013 г. EUCAST публикува и препоръчва фенотипни комбинирани дискови методи с boronic acid, dipicolinic acid, EDTA и cloxacillin като методи за потвърждаване на карбапенемазна активност в *Enterobactericeae* [9]. Фенотипната детекция на метало-бета-лактамазите (MBLs) (клас B ензими) чрез тези тестове се базира на специфичното инхибиране на тези ензими от EDTA и dipicolinic acid. В практиката най-често се използват двойнодисковият тест за синергизъм (ДДТС) и комбинираният дисков метод (КДМ), в основата на които е синергизмът между MBL инхибитора и оксииминоцефалспорин или карбапенем, демонстриран чрез синергично разширяване зоната на задръжка на бактериалния растеж (деформация на зоната) или увеличаване на диаметъра зоната на задръжка за диска антибиотик (imipenem, meropenem, ertapenem), потенциран с инхибитор в сравнение с антибиотика самостоятелно. И двата метода се отличават с висока чувствителност, дори за изолати с ниско ниво на резистентност към карбапенеми [16]. Препоръката на експерти на EUCAST е разликата ≥ 5 mm в зоновите диаметри между диска meropenem (10 mg) и диска meropenem + EDTA (0.25 M) да се интерпретира като съмнителна за продукция на MBL [11]. Аналогично, фенотипната детекция на KPC ензимите (клас A) се базира на инхибиращия ефект на boronic acid и нейните деривати върху този тип ензими. Както при MBLs и тук могат да се приложат два варианта за детекция – ДДТС и КДМ. Тези тестове се характеризират с висока чувствителност при детекция на KPC продуценти [13]. Потенциални проблеми могат да се появят при изолати с намалена чувствителност към карбапенеми, която е свързана с хиперпродукция на AmpC бета-лактамази (цефалоспоринази) и намалена проницаемост на външната мемб-

рана. Трябва да се има предвид, че boronic acid може значително да инхибира AmpC ензимите [2], поради това едновременното използване на диск boronic acid и диск cloxacillin, като последният преимуществено ще инхибира цефалоспориназите, е полезно за диференциране на двата типа карбапенемази. В настоящото проучване ДДТС с boronic acid, dipicolinic acid и EDTA и комбинираният дисков тест с cloxacillin доказаха карбапенемазна активност в проучваните изолати: продукция на KPC и MBL (VIM-1), като ефектът на синергизъм беше еднакво проявен и с imipenem, и с meropenem и в двата вида продуценти. Негативният комбиниран тест с cloxacillin потвърди липсата на AmpC продукция и коректно идентифицира изолатите, които продуцираха карбапенемаза от клас А (KPC-2).

В колекцията от тествани изолати *K. pneumoniae* три продуцираха едновременно KPC-2 и VIM-1 карбапенемази, като демонстрираха ефект на синергизъм едновременно с boronic acid и dipicolinic acid/EDTA. Появата на изолати *K. pneumoniae*, копродуценти едновременно на KPC и MBL ензими, е доказана в редица държави (Германия, Италия, Гърция) [13]. Детекцията на такива изолати може да бъде затрудняваща, тъй като при използването на инхибиторни тестове само с един инхибитор тестовете могат да се отчетат като фалшиво отрицателни за едната или и за двете карбапенемази [18]. EUCAST препоръчва използването на дискове meropenem, натоварени едновременно с двата инхибитора (EDTA/dipicolinic acid и phenylboronic acid/aminophenylboronic acid) за доказване на изолати, продуциращи едновременно карбапенемази от клас А и В [9].

Поради липсата на специфичен инхибитор за клас D карбапенемази, използваните дискови методи не успяха да идентифицират единствения изолат *K. pneumoniae*, продуцент на OXA-48 карбапенемаза. Според препоръките на EUCAST, индикаторен антибиотик за OXA-48 продукция може да бъде temocillin и по-специално високото ниво на резистеност към temocillin (МПК > 32 mg/L) или зона на задръжка < 11 mm. OXA-48 продуцентите демонстрират много високи МПК за този антибиотик, което трябва да се вземе под внимание при отсъствие на синергизъм със специфичните инхибитори за клас А и клас В карбапенемази. Този маркер не е специфичен за OXA-48 карбапенемаза, тъй като и други механизми на резистентност могат да обусловят такъв фенотип на резистентност. Поради липса на специфичен инхибитор за клас D карбапенемази (OXA-48) в рутинната практика трябва да се разчита най-вече на модифицирания Hodge тест, който ще идентифицира изолати–продуценти на този тип ензими, както е в конкретния случай. Впоследствие резултатът трябва да се потвърди чрез молекулярногенетични методи (PCR, секвениране), които са надеждните методи за детекция на изолати от *Enterobacteriaceae*, суспектни за такава продукция.

## Заключение

Фенотипният метод, базиращ се на инхибиране на карбапенем-хидролизиращия ензим от специфичен инхибитор, е точен метод за идентификация на ензимите от клас А и В, но не и клас D (поради липсата на специфичен инхибитор). В тези случаи в рутинната практика може да бъде използван модифицираният тест на Hodge за детекция на OXA-48 продуценти. Фенотипните методи (Hodge тест, ДДТС, КДМ) за детекция на карбапенемазна активност сред Грам-отрицателните бактерии са особено подходящи за приложение в клиничната микробиологична лаборатория поради лесното техническо изпълнение и сходството с широко използваните в практиката методи за детекция на ESBLs. Комбинираното прилагане в рутинната практика на модифицирания тест на Hodge и фенотипните методи, базирани на специфично инхибиране на ензимите, е нескъпа методика и осигурява относително бърза детекция на изолатите *K. pneumoniae*, продуценти на карбапенемази, пряк резултат, от което е подобрен контрол върху възникването и разпространението на вътреболничните инфекции, причинени от тези микроорганизми. За потвърждаване на резултатите от фенотипните тестове и за точната идентификация на гените, кодиращи съответните карбапенемази се използват молекулярногенетични техники (PCR, Realtime PCR, хибридизационни техники, секвениране), които се прилагат най-вече в референтните и научни лаборатории. Безспорни предимствата са бързината и отличната чувствителност и специфичност на тези методи.

### Библиография


1. Стоева, Т., Р. Марковска, М. Божкова, К. Божкова, В. Каменова, Д. Димитрова, И. Митов. Проучване на механизмите на резистентност към карбапенеми и епидемиологията на клинични изолати *Klebsiella pneumoniae*. XIII национален конгрес по клинична микробиология и инфекциозни болести на Българската асоциация на микробиолозите, София 16-18 април 2015 г.
2. Beesley, T., H. Gascoyne, Knott-Hunziker et al. The inhibition of class C beta -lactamases by boronic acids. Biochem J., 209, 1983, 229-233.
3. Borer, A., L. Saidel-Odes, K. Riesenberg et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella*

*pneumoniae* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol., 30, 2009, 72-976.
4. C a r v a l h a e s , C., R. Picao, A. Nicoletti et al. Cloverleaf test (Modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of results. J Antimicrob Chemother., 65, 2010, 249-251.
5. C L S I . Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
6. D a u t z e n b e r g , M., J. Ossewaarde, M. de Kraker et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. Euro Surveill., 19, 2014, Pii20723.
7. D o y l e , D., G. Peirano, C. Lascols et al. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. J Clin Microbiol., 50, 2012, 3877-3880.
8. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf
9. E U C A S T guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. http://www.eucast.org.
10. G i r l i c h , D., L. Poirel, P. Nordmann. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol., 50, 2012, 477-479.
11. G i r l i c h , D., D. Halimi, G. Zambardi et al. Evaluation of E test MBL strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae.* Diagn Microbiol Infect Dis., 77, 2013, 200-201.
12. H i r s c h , E., V. Tam. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug resistant infection. J Antimicrob Chemother, 65, 2010, 1119-1125.
13. H r a b a k , J., E. Chudackova, C. Papagiannitsis. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a chalange for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect., 20, 2014, 839-853.
14. M a r k o v s k a , R., T. Stoeva, I. Schneider et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. APMIS, 2015 Aug 25. doi: 10.1111/apm.12433.
15. M a r k o v s k a , R., I. Schneider, T. Stoeva et al. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing Klebsiella pneumoniae in Bulgaria. Diagn Microbiol Infect Dis., 77, 2013, 252-253.
16. M i r i a g o u , V., G. Cornaglia, M. Edelstein et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect., 16, 2010, 112-122.
17. M i r i a g o u , V., E. Douzinas, C. Papagiannitsis et al. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebisella oxytoca* with metallo-beta-lactamase encoding IncW plasmids: further spread of the $bla_{VIM-1}$ carrying integron In-e541. Int J Antimicrob Agents, 32, 2008, 540-541.
18. M i r i a g o u , V., E. Tzelepi E, S. Kotsakis et al. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliabilty for the double carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect., 19, 2013, 412-415.
19. N o r d m a n n , P., L. Poirel. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect., 20, 2014, 821-830.
20. N o r d m a n n , P, M. Gniadkowski, C. Giske et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect., 18, 2012, 432-438.
21. P a s t e r a n , F., T. Mendez, L. Guerriero et al. Sensitive Screening tests for suspected Class A carbapenemase production in species *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol., 47, 2009, 1631-1639.
22. P a s t e r a n , F., T. Mendez, M. Rapoport M et al. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemases in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. J Clin Microbiol., 48, 2010, 1323-1332.
23. P o i r e l , L., A. Potron, P. Nordmann. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother., 67, 2012, 1597-1606.
24. P s i c h o g i o u , M., P. Tassios, A. Avlamis et al. Ongoing epidemic of $bla_{VIM-1}$ – positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. J Antimicrob Chemother., 61, 2008, 59-63.
25. S e a h , C., D. Low, S. Patel et al. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae.* J Clin Microbiol., 49, 2011, 1965-1969.
26. T h o m a s , C., L. Moore, N. Elamin et al. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. Int J Antimicrob Agents, 42, 2013, 531-536.
27. Y i g i t , H., A. Queenan, G. Anderson et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-I, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agent Chemother., 45, 2001, 1151-1161.
28. Y o n g , D., M. Toleman, C. Giske et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamese gene, $bla_{NDM-I}$, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agent Chemother., 53, 2009, 5046-5054.

*Постъпила за печат на 15 септември 2015 г.*