

ГЛАВА 3 | БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ: ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

Тема бета-лактамаз, продуцируемых многими часто встречающимися возбудителями распространенных инфекций, заслуживает особого внимания по ряду причин.

1. Эти ферменты являются основным фактором устойчивости ко многим, а в некоторых случаях ко всем бета-лактамным антибиотикам, т. е. к пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, карбапенемам, большинства грамотрицательных бактерий. Очевидно, что речь идет о резистентности к тем группам антибиотиков, которые являются основными (антибиотиками первого ряда) в лечении тяжелой инфекционной патологии.
2. Продуцентами бета-лактамаз, способных инактивировать бета-лактамные антибиотики, являются эшерихии, протеи, клебсиеллы, другие представители семейства *Enterobacteriaceae*, а также *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, некоторые другие грамотрицательные палочки, т. е. возбудители таких тяжелых патологий, как сепсис, пневмония, перитонит, раневая инфекция, муковисцидоз и мн. др., в лечении которых антибиотики (прежде всего, бета-лактамы) занимают важнейшее место.
3. Образование бактериями бета-лактамаз, возникновение устойчивости бактерий к пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам, значительно ограничивает или, что более правильно и более часто, исключает возможность использования этих антибиотиков для лечения инфекций. При этом круг перспективных лечебных препаратов, эффективных и безопасных, резко, порой катастрофически сужается.
4. Способность грамотрицательных бактерий «приспособляться» к селективному давлению антибиотиков оказалась значительной, в том числе путем синтеза ими бета-лактам

маз новой структуры и иного спектра действия. Уже сегодня известно более 200 бета-лактамаз грамотрицательных бактерий, каждая из которых своеобразна по способности гидролизовать тот или иной бета-лактаменный антибиотик. Это может быть степень его инактивации, продолжительность процесса, избирательность по отношению к тому или иному соединению. Но во всех случаях их действие ставит под сомнение или исключает возможность клинической утилизации антибиотиков бета-лактаменной структуры для лечебных целей.

5. Синтез бета-лактамаз грамотрицательными бактериями и возникшая в этой связи их устойчивость к бета-лактаменным антибиотикам очень часто не может быть определена традиционными, привычными для лабораторной службы клинических учреждений т.н. фенотипическими методами, а, попросту говоря, методом дисков и методом серийных разведений. Нужны специальные методы. Они есть, но далеко не все из них достаточно стандартизованы и в большинстве случаев не получили формального признания, не «узаконены».
6. Наконец, есть еще одна проблема, которая, казалось бы, не связана напрямую с продукцией бета-лактамаз, но имеющая прямое отношение к логике антибиотикотерапии больных, возбудитель которых является продуцентом этих ферментов. Синтез грамотрицательными бактериями бета-лактамаз достаточно часто, в силу особенностей генетического кодирования ферментообразования, является отражением полирезистентности микроба к широкому кругу antimicrobных препаратов, в том числе не бета-лактаменной структуры. Т.е., о чем уже упоминалось выше, речь идет о перспективности антибиотикотерапии в целом, о поиске ответа на вопрос — что будет завтра?

Анализируя приведенные характеристики проблемы бета-лактамаз грамотрицательных бактерий, возбудителей тяжелых и распространенных заболеваний человека, можно выделить две ее важнейшие стороны. Одна имеет очевидный клинический смысл: как лечить больного, какой антибиотик выбрать, если возбудитель заболевания образует бета-лактамазы, ограничивающие или исключающие применение наиболее эффективных и относительно

безопасных антимикробных препаратов. Другая, относящаяся к деятельности лабораторной службы клинического учреждения, — как установить ферментообразование, как определить круг тех антибиотиков, которые с достаточной достоверностью можно рекомендовать лечащему врачу для борьбы с инфекцией. Найти ответ на эти вопросы задача сложная. Но решения необходимы, поскольку достаточно часто являются важнейшими для достижения успеха в терапии заболевания. Нет надобности говорить о том, что обе стороны проблемы — клиническая и лабораторная — тесно связаны. Роль лабораторной службы в данном случае исключительно велика. Об этом стоит напомнить хотя бы потому, что многие лаборатории отечественных лечебных учреждений неохотно используют методики тестирования образования бета-лактамаз. Назвать такие исследования частыми, пока, явное преувеличение.

Попытаемся далее привести кратко то основное, что сделано для решения проблемы. Прежде всего, необходимо вспомнить о каких ферментах идет речь, почему они стали объектом столь интенсивного изучения именно сейчас, когда, казалось бы, создана большая номенклатура антимикробных препаратов. Сделаем в этой связи несколько оговорок. Во-первых, речь пойдет только о бета-лактамазах грамотрицательных бактерий. Во-вторых, интенсивно изучаются бета-лактамазы лишь определенной группы грамотрицательных бактерий — это, прежде всего, несколько родов и видов семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.* и нек. др.), а также некоторые из т.н. неферментирующих бактерий (*Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*) Особое внимание уделено *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxitoca*, *P.aeruginosa* как частым возбудителям инфекций человека и, что более важно, как очевидным продуцентам новых вариантов бета-лактамаз. Еще одна важная оговорка, центральное место в исследованиях занимают «бета-лактамазы расширенного спектра действия», БЛРС (в английском варианте ESBL — extended spectrum beta-lactamase (-s)). Почему это так заслуживает отдельного упоминания (о чем ниже). Однако, дело не ограничивается только БЛРС (ESBL). Есть еще несколько групп бета-лактамаз, имеющих серьезное клиническое значение, поскольку их продукция ведет к устойчивости возбудителей заболеваний. Она при лечении больного трудно преодолеваема простой сменой антибиотика и далеко не всегда диагностируема общепринятыми методами определения чувствительности бактерий к

антибиотикам. Кроме того, один и тот же микроб может продуцировать бета-лактамазы, принадлежащие к разным группам. Один фермент может маскировать действие другого, а в лечебном плане их суммарное действие еще более осложняет выбор антимикробного средства. Значит эти «другие» бета-лактамазы тоже нужно уметь выявлять. А для того, чтобы определять их присутствие, о них надо помнить, их надо уметь «увидеть». Очень не простой для диагноста клубок, и, отметим сразу, до сих пор далеко не запутанный. Тем не менее, и значимая информация есть, и методические подходы к выявлению бета-лактамаз, хотя и не для всех, но предложены. Один из них, касающийся БЛРС, даже вошел в отечественные методические указания. Теперь, после этих необходимых оговорок, остановимся на главном.

Прежде всего, закономерно поставить вопрос — какие бета-лактамазы известны. Т.е. речь идет о классификациях этих ферментов. Они есть (заметим — «они», их несколько). Сегодня наиболее часто упоминают две классификации. Одна из них, принадлежащая R. Ambler, группирует бета-лактамазы по их молекулярной структуре. Любопытный читатель нередко в литературе, где упоминаются бета-лактамазы, найдет указание на принадлежность фермента к классу А, В, С или D. Так распределил их R. Ambler, исходя из последовательности аминокислот в молекуле активного центра и некоторых других структурно-функциональных характеристик фермента [28]. Несколько иной подход был использован К. Bush с соавторами [42], которые попытались при классификации бета-лактамаз, не исключая их принадлежность к тому или иному молекулярному классу по R. Ambler, взять за основу спектр их действия на антибиотики бета-лактаманной структуры и чувствительность к ингибиторам бета-лактамаз [60].

Естественно, что каждая классификация интересна настолько, насколько она позволяет решить те или иные задачи: будь то научные, будь то чисто практические (или те, и другие). В таблицах 3.1 и 3.2 приведены характеристики ферментов, которые авторы дают на основе упомянутых выше подходов. Первая из них отражает взгляды стандартизаторов CLSI (США), которые использовали градацию R. Ambler; другая — предложена по классификации бета-лактамаз К. Bush и др. [42, 50, 51]. Их взвешенность, обоснованность ни в коей степени не вызывает сомнений. Табличные данные в достаточной мере отражают современные представления, сегодняшний уровень знаний о бета-лактамазах. Но есть один момент,

Таблица 3.1

**Бета-лактамазы грамотрицательных бактерий
(дано по [49] с незначительными изменениями)**

Класс	Активный центр	Представители
A	Серин	Большинство БЛРС, а также TEM-1, SHV-1, KPC
B	Цинк	Металло-бета-лактамазы: VIM, IMP, SPM
C	Серин	AmpC
B	Серин	OXA

Таблица 3.2

**Диагностические признаки бета-лактамаз
групп БЛРС, AmpC и металло-бета-лактамаз
[42, 50, 74, 99]**

Бета-лактамазы (БЛ)	Чувствительность к ингибиторам БЛ*					Антибиотики, инактивируемые БЛ**						
	Клавулановая кислота	ЭДТК	Клоксациллин	Борониевые кислоты	Ампициллин	Амоксициллин/клавулановая кислота	Азтреонам	Цефокситин	Цефотаксим	Цефтазидим	Цефепим	Карбапенемы***
БЛРС (ESBL)	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
AmpC-бета-лактамазы	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	- или ±	-
Металло-бета-лактамазы	-	+	-	-	+	+	±	+	+	+	+	+

* (+) — ингибирует; (-) — не ингибирует

** (+) — инактивирует; (-) — не инактивирует; (±) — инактивируют отдельные представители данной группы БЛ или процесс инактивации частичный и длительный

*** — имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем.

ние микробом БЛРС, практически не отличается от рекомендованного метода отечественных МУК. Единственно, на что обращено внимание, — целесообразность при оценке качества исследования использовать культуру *K.pneumoniae* ATCC 700603, которая образует БЛРС. В соответствующих исследованиях МПК цефотаксима и цефтазидима, если их используют вместе с клавулановой кислотой, должны уменьшаться в 8 раз, т.е. происходит сдвиг на 3 пробирики. Например, если МПК цефалоспоринов 8 мкг/мл, а вместе с клавулановой кислотой 1 мкг/мл, то тест на БЛРС считают положительным, если 2 и 4 мкг/мл, то сомнительным или отрицательным. В качестве «отрицательного» контроля, используют *E. coli* ATCC 25922, для которой МПК цефотаксима и цефтазидима при их совместном использовании с клавулановой кислотой, не меняется или изменяется в 2–4 раза, что не считается показателем образования фермента.

Вернемся к определению БЛРС с помощью дисков. Преимущество двух приведенных выше очень близких по технологии вариантов диск-диффузионного метода заключается в том, что они стандартизованы. При всей противоречивости сложившейся ситуации в связи с недавними изменениями контрольных показателей чувствительности к бета-лактамам они дают возможность микробиологу формализовать свои исследования, придать им легитимность (а это во всем мире очень важная составляющая жизни любого врача). Но приведенными методиками далеко не ограничивается весь потенциал установления образования БЛРС. Есть несколько других подходов, простых и доступных, о которых следует упомянуть. В большинстве вариантов они построены на потенцирующем действии ингибиторов бета-лактамаз, клавулановой кислоты в первую очередь. Есть очень простое исследование, которое выполнимо в рамках обычного определения чувствительности микроба к антибиотикам. Когда речь идет о чувствительности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* среди тех дисков, которые используют, обязательно присутствуют диски с цефотаксимом и/или цефтриаксоном, а также с сочетанием амоксициллина и клавулановой кислоты. В последнем диске с точки зрения диагностики БЛРС микробиолога интересует не антибиотик, а ингибитор. Диск с сочетанием амоксициллина и клавулановой кислоты помещают на расстоянии 3 см от диска с цефалоспориновым антибиотиком (от центра диска к центру другого). Если используют два диска (цефотаксим и цефтриаксон), то диск с амоксициллином и клавулановой

кислотой помещают между ними. Все остальные действия — как обычно (питательная среда, приготовление и использование инокулюма, инкубация и пр.). Когда через 16–18 ч определяют результат, обращают внимание на зону подавления роста микроба вокруг диска с цефотаксимом (или цефтриаксоном, или обоими). Может быть так, что зона меняет свои очертания, она теряет обычную округлость. Есть несколько вариантов. Или зона принимает вытянутую с одной стороны яйцевидную форму, причем асимметричность расположена там, где диск соседствует с диском, содержащим клавулановую кислоту. Или между двумя зонами образуется своего рода «проплевшина» (слабый рост или участок полного его отсутствия). Или зона вокруг диска с цефалоспориновым антибиотиком образует выброс, что-то вроде «протуберанца» и др. Во всех случаях это результат действия ингибитора бета-лактамаз, диффундирующего из диска с сочетанием (ампициллин и клавулановая кислота), подавляющего БЛРС и позволяющего антибиотику из

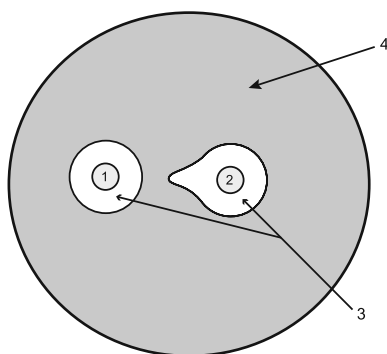


Рис. 3.1. Схема исследования на образование микроорганизмом БЛРС. Использование диска с амксициллином и клавулановой кислотой

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с амксициллином и клавулановой кислотой (КК).

2 — Диск с антибиотиком цефалоспориновой группы 3-го поколения (цефотаксим, цефтриаксон и др).

3 — Зона подавления роста.

4 — Микробный газон.

Деформация зоны подавления роста вокруг диска с антибиотиком цефалоспориновой группы (2) является результатом диффузии из диска с амксициллином и клавулановой кислотой (1) ингибитора (КК). Подавляется БЛРС, образуемая тестируемым микробом. Если микроб БЛРС не образует, деформации зоны подавления роста не происходит.

соседнего диска подавить рост культуры. Если подобная аномалия выражена отчетливо, можно с уверенностью утверждать — микроб образует БЛРС. К сожалению, когда фермента мало, эффект может быть нечетким и тогда трудно утверждать, есть ли он. Поэтому предлагают уменьшить расстояние между дисками до 2 см. Но в этом случае есть опасность наползания одной дозы на другую. А это тоже может затруднить чтение результата.

Заметим, что приведенный эффект достигим не только при использовании дисков с цефотаксимом и цефтриаксоном, но и с азтреонамом, цефтазидимом, цефепимом и нек. др. бета-лактамидами.

Предлагают таким же образом использовать диск только с клавулановой кислотой (10 мкг/диск). Он не дает зоны, как это бывает, когда используют ингибитор в сочетании с амоксициллином (эта зона иногда мешает чтению результата). Но тогда исследование носит специальный характер — появляется дополнительный диск. Некоторые результаты таких исследований приведены на рис. 3.1 и 3.2.

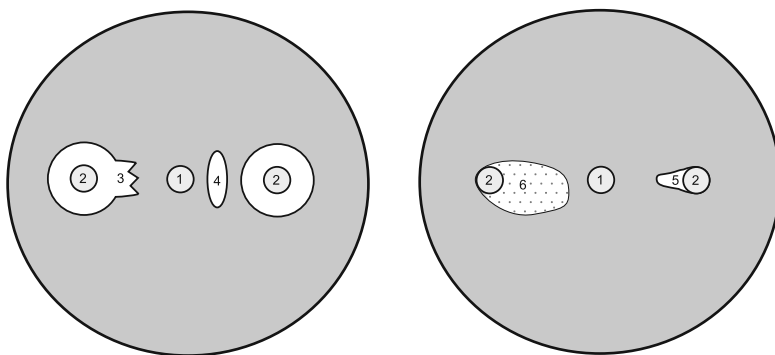


Рис 3.2. Схема определения БЛРС с использованием диска, пропитанного клавулановой кислотой. Варианты, подтверждающие ферментообразование микробом, образующим газон

Комментарии к рисунку:

1 — Диск с клавулановой кислотой (КК).

2 — Диск с антибиотиками, которые разрушают БЛРС.

3 — Деформация зоны подавления роста (образование «языка»).

4 — Дополнительная зона подавления роста микроба.

5 — Зона отсутствует, но со стороны диска с ингибитором участок подавления роста микроба.

6 — Зона отсутствует. Но со стороны диска с ингибитором участок частичного подавления роста микроба (внутри зоны разрозненные мелкие колонии или вуалеобразный рост).

Интересное предложение сделано разработчиками Е-теста. Предложено с помощью одной полоски определять МПК антибиотика и антибиотика в сочетании с клавулановой кислотой. Препарат (цефотаксим, цефтазидим или др.) расположен на одном конце полоски, и он же с клавулановой кислотой — на другом. Соответственно деления с указанием концентраций также есть с одного и другого конца. Образуются две зоны. Если МПК с обеих сторон полоски совпадают — БЛРС нет. Если там, где антибиотик сочетается с клавулановой кислотой, зона подавления роста увеличивается на 3 деления (т. е. МПК уменьшается в 8 раз), это трактуется как очевидный признак образования фермента. Подобные приспособления для Е-теста выпускаются как коммерческая продукция и получили определенное признание (в том числе, упоминаются в ряде методических пособий за рубежом).

Любопытный и очень демонстративный метод определения БЛРС был предложен в конце прошлого века К. Thomson с соавторами [193]. Он получил название Three-Dimensional Test. Авторы назвали его так, считая, что в нем к двухдискovому методу определения чувствительности добавляется еще один шаг. Поэтому на русский язык с определенной условностью можно перевести название метода как «трехшаговый». В чем его суть (далее будет дан вариант К. Thomson и С. Sanders)? Авторы использовали известный факт влияния плотности инокулюма (концентрации микробных клеток в инокулюме) на образование и, соответственно, активность бета-лактамаз. Чем больше концентрация клеток, тем вероятнее проявление гидролитического действия фермента, тем меньше будет проявляться действие антибиотика. А раз так, то и зона подавления роста вокруг диска будет уменьшаться. Вопрос заключается в том, как совместить на одной чашке два инокулюма, как дать возможность на одной и той же чашке с питательной средой вокруг одного и того же диска с антибиотиком проследить рост (или его отсутствие) одного и того же микроба, но с разным количеством клеток в инокулюме. Авторы предложили довольно простое решение. Готовят две взвеси изучаемого микроорганизма: одну (первый инокулюм) по стандартной методике (как для определения чувствительности), т. е. с содержанием микроба около $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл (по стандарту мутности 0,5 McFarland). Второй инокулюм должен содержать на порядок, а лучше на два порядка клеток больше, т. е. от 10^9 до 10^{10} КОЕ/мл. Приготавливают чашку с плотной питательной средой — агаром Мюллера-Хинтон или иной средой, используемой для определения

ведений и их количество могут меняться в зависимости от свойств тестируемого штамма и антимикробного препарата. Обязательны два ряда для каждого антибиотика: первый — в пробирках или лунках содержится питательная среда с двукратно убывающими концентрациями антибиотика. Второй ряд — в емкостях содержатся двукратно убывающие концентрации антибиотика и ингибитор, борониевая кислота, в одной и той же концентрации — 300–400 мкг/мл. Т.е. и в любой пробирке, и в любой лунке ряда количество ингибитора не меняется. Для тестирования штамма на способность образовывать AmpC-бета-лактамазу целесообразно использовать не менее двух антибиотиков бета-лактамной структуры. Наиболее часто такими объектами являются цефтазидим и цефотаксим (или цефтриаксон). Однако, это могут быть и другие препараты, включая цефепим, цефоперазон, азтреонам, пиперациллин и др. Т.о. при использовании метода серийных разведений каждый штамм требует 4 ряда: два опытных (разведения антибиотиков с добавлением ингибитора) и два контрольных (только разведения антибиотиков). После инкубации сравнивают МПК каждого антибиотика для данного микроорганизма: взятого в виде монопрепарата и использованного вместе с ингибитором. И в данном случае нет «узаконенных» показателей, нет документально подтвержденных критериев, но, по аналогии с контрольными показателями для оценки БЛРС, считается, что сдвиг МПК в сторону уменьшения при сочетании антибиотика и ингибитора на 3 пробирки (лунки) является свидетельством способности штамма образовывать AmpC-бета-лактамазу.

Применение клоксациллина, как ингибитора, в процессе выявления AmpC-бета-лактамаз осуществляется аналогичным образом. Используют агар Мюллера-Хинтон, на который производят посев взвеси исследуемой культуры с содержанием $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Предварительно готовят диски с клоксациллином с содержанием 500 мкг/диск. В литературе есть предложения применять диски с другой концентрацией — от 300 до 500 мкг на диск, однако, чаще используют наибольшую концентрацию. Для определения чувствительности грамположительных бактерий к клоксациллину в дисках с этим антибиотиком надобности нет. Используют диски с оксациллином. Кроме того, концентрация клоксациллина, которая необходима для выявления AmpC-бета-лактамаз, слишком велика и не пригодна для определения чувствительности. Диски с содержанием клоксациллина 500 мкг выпускают некоторые зарубежные

фирмы, но распространения в нашей стране они не получили. Поэтому диски с 500 мкг/диск клоксациллина приходится готовить в лаборатории. Как уже отмечалось выше, полноценный диск впитывает около 0,02 мл воды (или водного раствора препарата). Поэтому в 0,02 мл растворителя должно быть 500 мкг клоксациллина. Для этого навеску антибиотика надо растворить так, чтобы в 1 мл было 25 мг препарата (т.е. 25 000 мкг). Тогда в 0,01 мл будет 250 мкг, а в 0,02 мл — 500 мкг. Этот раствор и наносят с помощью соответствующей автоматической пипетки или микропипетки на диск. За 30 минут происходит гарантированное полное всасывание раствора в диск (фактически процесс идет много быстрее) и диск может быть использован для определения присутствия AmpC-бета-лактамаз. Хранить диски, изготовленные в лаборатории, если отсутствуют соответствующий опыт их изготовления и необходимое оборудование, не рекомендуется. Впрочем, за ближайшие 7–10 дней с их активностью ничего не происходит, если диски не влажные и хранятся в рефрижераторе в укупоренном флаконе. Как и в случае с борониевыми кислотами клоксациллин можно использовать в диске, где уже есть бета-лактамный антибиотик (диск с сочетанием препаратов) и в виде диска только с ингибитором бета-лактамаз (т.е. с клоксациллином). В первом случае об образовании и активности фермента судят по разнице диаметров зон подавления роста тестируемого микроба вокруг диска только с антибиотиком и диска, в котором есть и антибиотик, и ингибитор. Если различия нет, AmpC-бета-лактамаза не образуется, если есть и увеличение диаметра зоны очевидно, то фермент присутствует. Насколько должна увеличиться зона, чтобы эффект считать достоверным, пока не договорились. Можно считать ферментообразование несомненным, если диаметр зоны увеличился на 5 мм и более. Если он возрос на 1–2 мм, этим фактом можно пренебречь. Промежуточные показатели говорят о необходимости дополнительных исследований. Можно считать убедительным мнение тех исследователей, которые предпочитают использовать отдельно диск с ингибитором и диск с антибиотиком. Они полагают такой тест более демонстративным. Особое внимание уделяется диску с цефокситином, в своем роде «маркерному» антибиотику при тестировании на продукцию AmpC-бета-лактамазы. Как уже говорилось, этот антибиотик разрушается данной группой ферментов. Грамотрицательные бактерии при таком механизме устойчивости могут не образовывать вокруг диска или образовывать небольшую зону

подавления роста. Располагают диск с ингибитором и с цефокситином на расстоянии 10 мм друг от друга. Если при использовании двух дисков зона подавления роста вокруг диска с цефокситином вытягивается в сторону диска с ингибитором или появляется зона подавления роста только со стороны диска с ингибитором, факт образования AmpC-бета-лактамазы можно считать доказанным. Другой диск с антибиотиком, который также обычно используют для этой же цели и располагают с другой стороны от диска с клоксациллином — диск с цефтазидимом. Сходный эффект влияния ингибитора на зонообразование вокруг диска с этим антибиотиком служит еще одним подтверждением наличия AmpC-бета-лактамаз. При работе с клоксациллином для выявления фермента (т. е. при его использовании как ингибитора) следует учитывать одну особенность, отличающую его от борониевых кислот. Как уже подчеркивалось, борониевые кислоты практически не обладают противомикробным действием, и зона подавления роста микроба вокруг диска с этими соединениями не образуется. В отличие от них клоксациллин, это антибиотик, взятый в большей концентрации, 500 мкг/диск. Такая и даже заметно меньшие концентрации недостижимы в организме человека и животных. Грамотрицательные палочки считаются устойчивыми к клоксациллину, поскольку в реально достижимых у человека концентрациях их жизнедеятельность не подавляется. Иное дело, когда *in vitro* идет диффузия в зараженный гель 500 мкг антибиотика. В таких случаях вокруг некоторых микроорганизмов (*E. coli*, *P. mirabilis*) может образоваться небольшая зона подавления роста микроба. Если диски расположены близко друг к другу, иногда это может мешать оценивать результаты исследования. Зоны, как бы, накладываются друг на друга. Проблема решается достаточно просто, диски следует «развести» на большее расстояние. Но, естественно, опыт для этого необходимо повторить.

Технология определения металло-бета-лактамаз (МетБЛ) имеет как много общего с уже упомянутыми методами определения БЛРС и AmpC-бета-лактамаз, так и свою специфику. В первом варианте она базируется на применении ингибиторов МетБЛ. Исследования проводятся по той же схеме, что и выявление двух других групп ферментов. Хотя, как уже говорилось, у каждой группы свои ингибиторы. Кроме того, часто прибегают к т. н. Hodge Test (ходж-тесту, ХТ). Условно, его можно назвать «тестом с помощником». Принцип метода сводится к тому, что исследуемый микроб, если он образует МетБЛ, помогает заведомо чувствительному штамму

преодолеть действие бета-лактамного антибиотика. Если тестируемый микроб не образует МетБЛ, то подавление роста референтного штамма происходит, как сейчас модно говорить, «в штатном режиме». О том, каким образом это делается, чуть ниже. О ХТ необходимо говорить еще и потому, что в свой время он был включен в стандарт CLSI, т. е. получил статус официально признанного, стандартного. Тест достаточно демонстративен и может быть использован не только для определения МетБЛ, но, подбирая соответствующим образом референтную культуру и антибиотик, можно определять разные группы ферментов (что и делается). Однако, признание он нашел прежде всего как тест, с помощью которого можно определять карбапенемазы, т. е. те ферменты, которые чаще всего определяют устойчивость грамотрицательных бактерий к карбапенемам. МетБЛ составляют их основную (но не единственную) группу. Если при тестировании использовать в качестве антибиотического компонента именно карбапенемы (например, меропенем или эртапенем), а в качестве референтного штамма (заведомо чувствительного штамма) *E. coli* (например, ATCC 25922, которым должна располагать любая микробиологическая лаборатория), то исследование на МетБЛ окажется достаточно специфичным, информативным, хотя бы настолько, чтобы подтвердить нецелесообразность (или, наоборот, возможность) применения карбапенемов в лечебных целях у конкретного больного с учетом свойств выделенного возбудителя инфекции.

Последовательность действий при постановке ХТ не сложна и традиционна для микробиолога с технической точки зрения. Готовят чашку с агаром Мюллера-Хинтон. Приготавливают взвесь суточной культуры референтного штамма *E. coli* ATCC 25922 по стандарту 0,5 McFarland с последующим разведением 1:10 или без него, т. е. получают обычную взвесь микроба, какую используют при определении чувствительности любой культуры к антибиотикам — $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для исследования также необходима суточная культура тестируемого штамма на плотной питательной среде, лучше в чашке с ростом изолированных типичных (контролируемых глазом) колоний. Но, в принципиальном плане, это не так уж и важно. Может быть газон и на чашке, и на скошенном агаре в пробирке. Главное — культура должна быть чистой. Стандарт CLSI рекомендует для получения суточной культуры исследуемого микроба использовать кровяной агар. Очень желательно (и это предусмотрено зарубежным стандартом), что-