

## Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси

Тапальский Д.В.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Контактный адрес:  
Дмитрий Викторович Тапальский  
Эл. почта: tapalskiy@gsmu.by

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, резистентность, комбинации антибиотиков, МСВТ, бактерицидная активность.

**Цель.** С использованием модифицированного метода тестирования бактерицидности различных комбинаций (multiple combination bactericidal testing, МСВТ) оценить чувствительность к комбинациям антимикробных препаратов (АМП) нозокомиальных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих карбапенемазы.

**Материалы и методы.** В исследование включены 63 изолята *K. pneumoniae*, 31 изолят *P. aeruginosa*, 84 изолята *A. baumannii*, выделенных в 2013-2017 гг. от госпитализированных пациентов из 28 организаций здравоохранения 4 регионов Беларуси. Все изоляты были продуцентами карбапенемаз различных типов (ОХА-48, КРС, NDM, VIM, ОХА-23, ОХА-40). Определение чувствительности к АМП выполнено автоматизированным методом и методом микроразведений в бульоне. Чувствительность к комбинациям АМП определялась модифицированным методом МСВТ. В составе комбинаций тестировали АМП, взятые в концентрациях, соответствующих пограничным фармакокинетическим/фармакодинамическим (ФК/ФД) концентрациям для стандартных режимов дозирования. Тестировали 11 основных и 11 дополнительных комбинаций АМП.

**Результаты.** Выявлены высокие значения МПК меропенема у большинства исследуемых изолятов, в 4 и более раз превышающие пороговые ФК/ФД концентрации. Нечувствительными к колистину были 42,9% *K. pneumoniae*, 51,6% *P. aeruginosa* и 2,4% *A. baumannii*. С помощью модифицированного метода МСВТ обнаружены комбинации АМП с бактерицидной активностью для 177 (99,4%) включенных в исследование изолятов; для 155 изолятов (87,1%) выявлено по 3 и более бактерицидных комбинаций АМП. Наиболее активными были комбинации с колистином, в том числе для изолятов с МПК колистина выше пороговой ФК/ФД концентрации. Выявлена бактерицидная активность комбинаций меропенем + амикацин и амикацин + левофлоксацин в отношении 51,9% нечувствительных к колистину изолятов *K. pneumoniae*. В отношении *P. aeruginosa* наиболее активными были комбинации меропенем + колистин (85,7%) и имипенем + колистин (84,1%). В отношении *A. baumannii* для всех комбинаций с колистином выявлена бактерицидная активность, близкая к 100%.

**Выводы.** Выявлена видовая и штаммовая специфичность проявления бактерицидной активности различных комбинаций АМП. Обоснована необходимость определения чувствительности к комбинациям АМП с целью назначения эффективной антибиотикотерапии.

## Susceptibility to antibiotic combinations among nosocomial carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated in Belarus

Tapalski D.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Contacts:  
Dmitry V. Tapalskiy  
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial resistance, antibiotic combinations, МСВТ, bactericidal activity.

**Objective.** To assess a susceptibility to antibiotic combinations in nosocomial carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates using a modified method of multiple combination bactericidal testing (МСВТ).

**Materials and methods.** A total of 178 isolates (63 *K. pneumoniae* isolates, 31 *P. aeruginosa* isolates, 84 *A. baumannii* isolates) obtained in the 2013-2017 from hospitalized patients in 28 public health organizations in 4 Belarus regions were included in the study. All isolates were producers of the different carbapenemases (ОХА-48, КРС, NDM, VIM, ОХА-23, and ОХА-40). The susceptibility to antimicrobial agents was determined by an automated method and a broth microdilution method. A modified МСВТ method was used for determination of susceptibility to antibiotic combinations. Antibiotic concentrations corresponding to the threshold pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) concentrations for standard doses of antimicrobial agents were used for testing antibiotic combinations. A total of 11 primary and 11 additional antibiotic combinations were tested.

**Results.** The meropenem MIC values were 4 or more times higher than the threshold PK/PD concentrations for most isolates studied. A total of 42.9% of *K. pneumoniae* strains, 51.6% of *P. aeruginosa* strains and 2.4% of *A. baumannii* strains were non-susceptible to colistin. Using the modified MCBT method, antibiotic combinations with bactericidal activity were detected for 177 (99.4%) isolates; 3 or more antibiotic combinations were bactericidal for 155 isolates (87.1%). The colistin-containing combinations were the most active, including against isolates with colistin MIC values above the threshold PK/PD concentration. The bactericidal activity of meropenem + amikacin and amikacin + levofloxacin combinations against 51.9% of *K. pneumoniae* colistin-resistant isolates was determined. The meropenem + colistin (85.7%) and imipenem + colistin (84.1%) combinations were the most active against *P. aeruginosa*. All the colistin-containing combinations were bactericidal against nearly 100% of *A. baumannii* isolates.

**Conclusions.** Species-level and strain-level specificity of bactericidal activity for the different antibiotic combinations was found.

## Введение

Важнейшей задачей клинической микробиологической лаборатории является предоставление прогностической информации, необходимой для проведения эффективной антибиотикотерапии. В условиях глобального распространения грамотрицательных бактерий с экстремальной антибиотикорезистентностью (XDR – extensively drug resistance) и появлением у отдельных изолятов панрезистентности (PDR – pandrug resistance), традиционный результат микробиологического исследования с интерпретацией антибиотикочувствительности выделенного микроорганизма в категориях «R-I-S» (резистентный – умеренно резистентный – чувствительный) часто не устраивает врача-клинициста, поскольку не дает ему выбора для назначения антибактериальной терапии. Проблема крайне ограниченного выбора антимикробных препаратов (АМП) для системной антибиотикотерапии особенно актуальна для энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий, способных к продукции приобретенных карбапенемаз [1, 2]. Для лечения инфекций, вызванных XDR и PDR грамотрицательными возбудителями, широко используется комбинированная антибиотикотерапия. Основной ее целью является достижение синергидного эффекта и расширение спектра активности в отношении полирезистентных возбудителей [3]. Микробиологическая эффективность комбинаций АМП трудно прогнозируема, что связано с различными уровнями резистентности (различными значениями МПК) и различными сочетаниями механизмов антибиотикорезистентности. Учитывая это, для подбора эффективных комбинаций АМП целесообразно проводить определение чувствительности к ним у XDR и PDR изолятов, выделенных от конкретного больного [4, 5].

С исследовательской целью для *in vitro* определения типа фармакодинамического (ФД) взаимодействия между АМП в составе комбинации (синергизм, аддитивное действие, нейтральный эффект, антагонизм) используются различные методы, к сожалению, слабо согласованные между собой. Наиболее известными из них являются метод «шахматной доски» (Checkerboard assay, СВ), несколько модификаций метода градиентной диффузии (например, кросс-тест с использованием полосок Е-теста), метод оценки кривых гибели бактерий (Time-kill assay, ТКА) [6]. Сравнение эффективности этих методов позволило выбрать ТКА в качестве наиболее чувстви-

тельного для выявления синергидных комбинаций АМП [7]. В 1999 г. Институт клинических и лабораторных стандартов США опубликовал документ, в котором был приведен стандартизованный протокол для выполнения ТКА [8]. Являясь в настоящее время единственным стандартизованным методом, ТКА наиболее широко используется для поиска синергидных комбинаций АМП. Существенными ограничениями, не позволяющими внедрить методы ТКА и СВ в рутинную практику клинических микробиологических лабораторий, является их значительная трудоемкость и высокие требования к компетентности персонала. К сожалению, исследователи не сообщали о клинических результатах проводимой комбинированной антибиотикотерапии и их корреляции с результатами определения чувствительности *in vitro*, полученными с использованием ТКА и СВ [7].

Модифицированный метод градиентной диффузии (кросс-тест) является наименее трудоемким, простым в постановке и интерпретации и, по этой причине, пригодным для рутинного использования. Ограничениями кросс-теста являются невозможность тестирования комбинаций трех и более АМП, сложность выявления антагонистических взаимодействий АМП [9-11]. Для микроорганизмов, имеющих МПК АМП, превышающую максимальную концентрацию на полоске Е-теста, проведение исследования не представляется возможным, что явилось ограничением, например, для выявления синергидных комбинаций в отношении изолятов *P. aeruginosa* ST235 – продуцентов металло-β-лактамаз (МБЛ) [12]. Согласованность результатов кросс-теста с результатами, полученными в ТКА, не превышает 75-88% [9], что может быть связано с различными целевыми параметрами для этих методов (бактериостатический эффект для кросс-теста и бактерицидный эффект для ТКА).

Во всех классических методах определения фармакокинетических (ФК) взаимодействий АМП (ТКА, СВ, кросс-тест) проводится тестирование концентраций, кратных МПК (обычно от 1/4 МПК до 2 МПК), что, во-первых, требует предварительного определения индивидуальных значений МПК для тестируемых штаммов, а во-вторых, в большинстве случаев не соответствует концентрациям, обнаруживаемым в организме человека. Некоторые авторы предпочитают тестировать в ТКА концентрации, достигающиеся в сыворотке крови при стандартных режимах дозирования [13].

В разработанном в конце 1990-х гг. в Канаде методе МСВТ (multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций) были впервые учтены особенности ФК АМП. Этим методом может выполняться тестирование комбинаций двух, трех или четырех АМП, каждый из которых вносится в фиксированной концентрации, соответствующей его пиковой сывороточной концентрации после введения стандартной дозы. МСВТ обычно проводится в 96-луночных планшетах и отличается высокой производительностью. Целевым параметром МСВТ является выявление бактерицидности комбинации (гибель  $\geq 99,9\%$  микроорганизмов), что подразумевает проведение высевов из лунок планшета на плотную питательную среду [14, 15].

В мире накоплен достаточный опыт проведения МСВТ для оптимизации антибиотикотерапии у пациентов с муковисцидозом [16-18]. Предпринимались попытки использования МСВТ для поиска бактерицидных комбинаций в отношении карбапенемазопродуцирующих *K. pneumoniae* [19] и *A. baumannii* [20]. Однако, с учетом накопленных с момента внедрения МСВТ данных о ФК и ФД АМП, используемый принцип тестирования пиковых сывороточных концентраций уже не кажется адекватным, особенно для время-зависимых АМП (например, цефалоспоринов и карбапенемов).

Рандомизированное, двойное слепое, контролируемое исследование с участием 251 пациента с обострениями муковисцидоза выявило, что назначение антибиотикотерапии с учетом результатов МСВТ не оказывало значимого влияния на клиническую и микробиологическую эффективность лечения по сравнению со стандартной антибиотикотерапией [21]. Основываясь на результатах этого исследования, Фонд муковисцидоза (Cystic Fibrosis Foundation) в 2009 г. исключил определение чувствительности к комбинациям АМП из рекомендаций по ведению пациентов с лёгочной формой муковисцидоза [22].

Более поздние исследования, основанные на тестировании в составе комбинаций методом МСВТ концентраций АМП, соответствующих пороговым видоспецифичным концентрациям для основных возбудителей муковисцидоза (в 2-8 раз отличающихся в меньшую сторону от используемых в первоначальном варианте МСВТ пиковых сывороточных концентраций), продемонстрировали лучшие клинические результаты. У пациентов, которым антибиотикотерапия назначалась по результатам МСВТ, в 4 раза реже развивалась бактериемия и эмпиема плевры [23].

На основе МСВТ создан и адаптирован микробиологический метод, позволяющий подбирать эффективные комбинации из двух или трех АМП, обладающие бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных XDR бактерий. В отличие от оригинального метода МСВТ, тестирование проводится для фиксированных концентраций АМП, аналогичных ФК/ФД концентрациям, создаваемым в организме при назначении стандартных доз [24].

**Целью** нашего исследования явилась оценка чувствительности к комбинациям антибиотиков нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и

*A. baumannii*, продуцирующих карбапенемазы, с использованием модифицированного метода МСВТ.

## Материалы и методы

В исследование было включено 178 MDR, XDR и PDR изолятов грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы (63 изолята – *K. pneumoniae*, 31 изолят – *P. aeruginosa*, 84 изолята – *A. baumannii*), выделенных в 2013-2017 гг. в рамках программ микробиологического мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в Беларуси [25, 26, 27]. Все микроорганизмы были выделены в диагностически значимых количествах из клинического материала (мокрота, кровь, раневое отделяемое, экссудат, интраоперационный материал, моча) от пациентов, госпитализированных в 28 организаций здравоохранения 4 регионов Беларуси, в том числе: Гомель – 69 изолятов из 9 организаций здравоохранения, районные центры Гомельской области (Добруш, Житковичи, Жлобин, Петриков, Речица, Рогачев, Хойники) – 24 изолята из 7 организаций здравоохранения, Витебск – 13 изолятов из 1 организации здравоохранения, Минск – 50 изолятов из 8 организаций здравоохранения, Могилев – 22 изолята из 3 организаций здравоохранения.

Для всех изолятов выполнена реидентификация с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact на идентификационных картах VITEK 2 GN (bioMérieux, Франция) или методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VITEK MS (bioMérieux, Франция). Определение чувствительности к АМП выполнено автоматизированным методом на анализаторе VITEK 2 Compact с использованием диагностических карт AST-N215 и AST-XN05.

После реидентификации штаммы помещались в рабочую коллекцию и хранились в триптиказо-соевом бульоне (BD, США) с добавлением 30% глицерина в замороженном состоянии при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Детекция генов карбапенемаз VIM, IMP, NDM, KPC, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-58 проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов АмплиСенс MDR MBL-FL, АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL, АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Экстракцию ДНК бактериальных культур, амплификацию с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия), анализ и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с инструкциями производителя диагностических наборов. Информация о распространенности генов карбапенемаз различных типов в исследуемой выборке микроорганизмов представлена в Таблице 1.

Поскольку определение чувствительности к колистину с помощью автоматизированных систем не позволяет получить надежные результаты [28, 29], то для получения истинных значений МПК дополнительно был использован метод микроразведений в бульоне

**Таблица 1.** Наличие генов карбапенемаз у изолятов исследуемой выборки микроорганизмов

	NDM	OXA-48	KPC	NDM+ OXA-48	VIM	OXA-23	OXA-40	OXA-23+ OXA-40
<i>K. pneumoniae</i>	5	41	15	2				
<i>P. aeruginosa</i>					31			
<i>A. baumannii</i>						3	79	2

Мюллера-Хинтон (BD, США). Методом микроразведений также определяли МПК меропенема (для всех микроорганизмов), тигециклина (для *K. pneumoniae* и *A. baumannii*) и сульбактама (для *A. baumannii*). Тестирование проводили в стерильных круглодонных 96-луночных полистироловых планшетах (Sarstedt, Германия) в соответствии с ISO 20776-1:2006 [30]. При учете и интерпретации результатов руководствовались стандартами EUCAST, версия 8.0 [31]. С целью контроля качества исследований параллельно с определением МПК для исследуемых изолятов выполняли аналогичное тестирование для контрольных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853; полученные для них значения МПК соответствовали целевым значениям или не выходили за пределы допустимых диапазонов.

Определение чувствительности к комбинациям АМП выполняли методом МСВТ [14] с некоторыми модификациями [24]. В отличие от оригинального метода МСВТ, в котором проводится тестирование пиковых сыровороточных комбинаций АМП, в нашем исследовании использовались пограничные ФК/ФД концентрации АМП (не видоспецифичные), приведенные в рекомендациях EUCAST [31] и других источниках (Таблица 2). Указанные концентрации для β-лактамов АМП и ами-

кацина были в 2-4 раза ниже концентраций, тестируемых оригинальным методом МСВТ.

Базовые растворы АМП готовили в соответствии с ISO 20776-1:2006 [30]. Из базовых растворов готовили рабочие растворы АМП, содержащие тестируемые ФК/ФД концентрации, увеличенные в 10 раз (с учетом последующего 10-кратного снижения концентрации при внесении всех компонентов в лунки планшета). В качестве разбавителя для приготовления рабочих растворов использовали бульон Мюллера-Хинтон. К базовому раствору фосфомицина дополнительно добавляли 250 мкг/мл глюкозо-6-фосфата для обеспечения его концентрации при тестировании 25 мкг/мл.

Комбинации из двух АМП готовили в лунках стерильных 96-луночных полистироловых планшетов (Sarstedt, Германия), смешивая по 10 мкл рабочих растворов АМП 1 и АМП 2 и добавляя 80 мкл суспензии исследуемой бактериальной культуры, приготовленной в МХБ и содержащей  $6 \div 8 \times 10^5$  бактериальных клеток в логарифмической фазе роста в 1 мл. Для тестирования одной культуры использовали горизонтальный ряд планшета, состоящий из 12 лунок, при этом в лунки 1-11 вносили различные комбинации из двух АМП, лунка 12 не содержала АМП и использовалась в качестве контроля роста культуры. На одном планшете в горизонтальных рядах А...Н проводили определение чувствительности к 11 комбинациям АМП одновременно для 8 различных бактериальных культур, принадлежащих одному виду. Для приготовления комбинаций из трех АМП смешивали в лунках планшета по 10 мкл рабочих растворов АМП 1, АМП 2 и АМП 3, затем вносили 70 мкл суспензии исследуемой бактериальной культуры, содержащей  $6 \div 8 \times 10^5$  бактериальных клеток в 1 мл.

Состав основных и дополнительных комбинаций АМП для различных видов микроорганизмов представлен в Таблице 3. После инокуляции лунок суспензиями исследуемых микроорганизмов планшеты закрывали

**Таблица 2.** ФК/ФД концентрации АМП для тестирования в составе комбинаций

Антибиотик	Тестируемая концентрация (ФК/ФД), мкг/мл	Режим дозирования, обеспечивающий ФК/ФД концентрацию (внутривенное введение)	Концентрация в оригинальном методе МСВТ, мкг/мл [14]
Меропенем	8	2000 мг × 3 раза в сутки	32
Имипенем	8	1000 мг × 3 раза в сутки	10
Цефтазидим	8	2000 мг × 3 раза в сутки	32
Азтреонам	8	1000 мг × 3 раза в сутки	32
Амикацин	16	15 мг/кг в сутки	32
Левифлоксацин	1	500 мг × 2 раза в сутки	2 (ципрофлоксацин)
Тигециклин	0,5	100 мг, затем по 50 мг каждые 12 ч	Не используется
Фосфомицин	32	4-8 г × 3 раза в сутки	Не используется
Колистин	2	2-3 МЕ × 3 раза в сутки	Не используется
Сульбактам	4	1000-2000 мг × 2 раза в сутки	Не используется
Ванкомицин	8	1000 мг × 2 раза в сутки	Не используется
Рифампицин	2	600 мг × 1 раз в сутки	Не используется

Таблица 3. Состав основных и дополнительных комбинаций АМП для тестирования модифицированным методом МСВТ

№ п/п	Основные комбинации из 2 АМП			Дополнительные комбинации из 2 или 3 АМП
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	
1	Меропенем-амикацин	Меропенем-амикацин	Меропенем-амикацин	Ванкомицин-колистин
2	Меропенем-левофлоксацин	Меропенем-левофлоксацин	Меропенем-левофлоксацин	Ванкомицин-меропенем
3	Меропенем-фосфомицин	Меропенем-колистин	Меропенем-сульбактам	Ванкомицин-имипенем
4	Меропенем-тигециклин	Имипенем-амикацин	Меропенем-тигециклин	Ванкомицин-амикацин
5	Меропенем-колистин	Имипенем-левофлоксацин	Меропенем-колистин	Рифампицин-колистин
6	Амикацин-колистин	Имипенем-колистин	Амикацин-колистин	Рифампицин-амикацин
7	Левифлоксацин-колистин	Цефтазидим-амикацин	Левифлоксацин-колистин	Ванкомицин-колистин-меропенем
8	Тигециклин-колистин	Цефтазидим-левофлоксацин	Сульбактам-колистин	Ванкомицин-колистин-имипенем
9	Фосфомицин-колистин	Цефтазидим-колистин	Тигециклин-колистин	Ванкомицин-колистин-амикацин
10	Амикацин-левофлоксацин	Амикацин-колистин	Тигециклин-сульбактам	Рифампицин-колистин-меропенем
11	Амикацин-тигециклин	Левифлоксацин-колистин	Амикацин-сульбактам	Рифампицин-колистин-амикацин

крышками, помещали в герметичные пакеты из полиэтилена для предотвращения испарения среды из лунок и инкубировали в течение 48 часов при температуре 35°C.

Для определения бактерицидного эффекта комбинаций АМП после инкубации планшетов делали количественный высев 10 мкл содержимого из каждой лунки на сектор плотной питательной среды (HiMedia, Индия). Использовали специальный шаблон с размеченными 12 секторами для нанесения 10-мкл капель (Рисунок 1) из ряда лунок планшета 1...12, на который помещали 90-мм чашку Петри с питательной средой. Чашки выдерживали на рабочем столе 20-30 мин до полного впитывания нанесенных капель в питательную среду, после чего переворачивали и инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 35±2°C. Пользуясь шаблоном (Рисунок 1), оценивали микробиологическую эффективность каждой из 11 тестируемых комбинаций АМП. Бактерицидная активность определялась как снижение на ≥99,9% количества микробных клеток в присутствии АМП по сравнению с исходным инокулятом. Положительный результат (бактерицидный эффект комбинации) регистрировали при отсутствии микробного роста в соответствующем секторе либо

при наличии роста в нем не более чем 1 колонии микроорганизмов.

В отношении изолятов с выявленным отсутствием бактерицидной активности всех основных двойных комбинаций АМП выполнялось повторное тестирование для набора дополнительных комбинаций, состоящих из 2 или 3 АМП (Таблица 2).

## Результаты и обсуждение

Из 63 карбапенемазопродуцирующих клинических изолятов *K. pneumoniae*, 2 изолята (3,2%) сохраняли чувствительность к меропенему (оба – продуценты карбапенемазы ОХА-48). Чувствительными к тигециклину были 88,9% изолятов (МПК<sub>50</sub>=1 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=2 мкг/мл), чувствительным к колистину – 57,1% изолятов (МПК<sub>50</sub>=2 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=8 мкг/мл). Значимый уровень устойчивости к тигециклину и колистину в исследуемой выборке может быть дополнительно обусловлен селекцией штаммов (преимущественным отбором для направления в референтную лабораторию и проведения молекулярно-генетических исследований штаммов с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью). Распределение значений МПК меропенема и колистина для изолятов *K. pneumoniae* представлено на Рисунке 2.

Результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* к комбинациям АМП представлены отдельно для колистиночувствительных изолятов (n=36, МПК колистина ≤2 мкг/мл) и нечувствительных к колистину изолятов (n=27, МПК колистина 4-32 мкг/мл). Отмечена бактерицидная активность всех комбинаций с колистином (меропенем + колистин, амикацин + колистин, левофлоксацин + колистин, тигециклин + колистин, фосфомицин + колистин) в отношении 81-100% колистиночувствительных изолятов (Рисунок 3), что может быть в большей мере связано с их чувствительностью к имеющейся в этих комбинациях концентрации колистина, равной 2 мкг/мл. В отношении нечувствительных к колистину изолятов бактерицидная активность колистин-содержащих комбинаций была

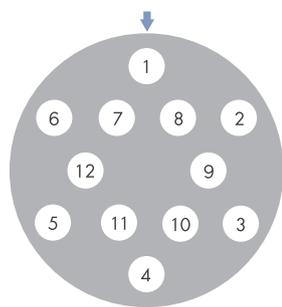
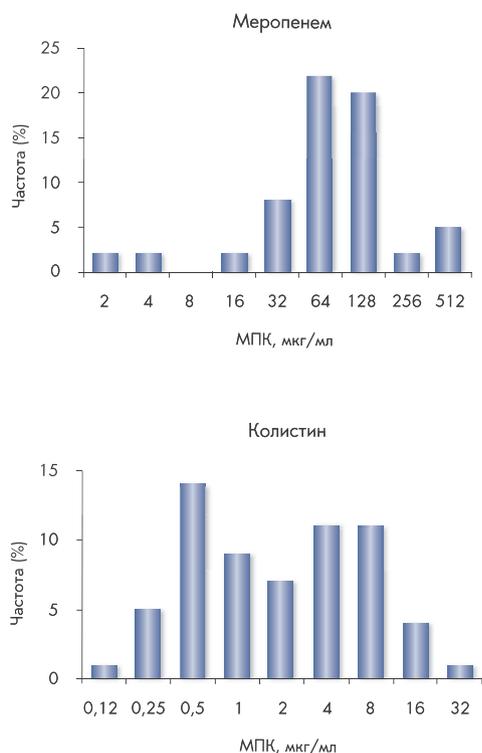


Рисунок 1. Шаблон для высева содержимого лунок планшета на плотную питательную среду при тестировании бактерицидности различных комбинаций АМП (диаметр шаблона 90 мм)

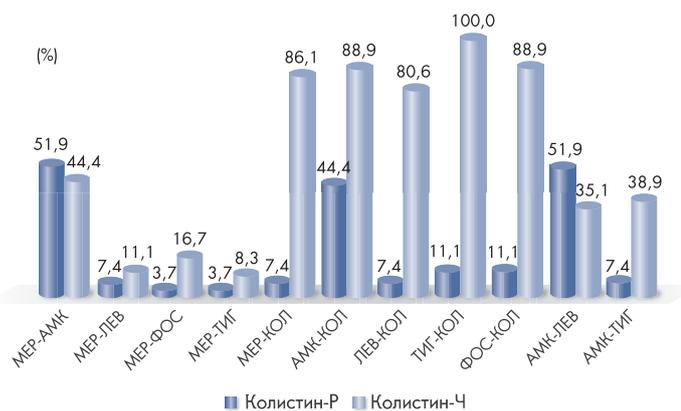


**Рисунок 2.** Распределение значений МПК меропенема и колистина для карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*

бактерицидной активности, что может быть связано с бактериостатическим действием препарата. Исключением стала бактерицидная активность комбинации тигецилин + колистин, проявляющаяся только в отношении колистиночувствительных изолятов (100%), и, таким образом, обусловленная их индивидуальной чувствительностью к колистину. Заслуживает внимания бактерицидная активность комбинаций меропенем + амикацин и амикацин + левофлоксацин в отношении 51,9% нечувствительных к колистину изолятов *K. pneumoniae*, что может быть проявлением синергидного эффекта этих комбинаций. Для 7 изолятов *K. pneumoniae* (11,1%) выявлена бактерицидная активность от 1 до 3 комбинаций АМП, для 45 изолятов (71,4%) – 4 и более комбинаций. В отношении 11 изолятов *K. pneumoniae* (17,5%) ни одна из основных двойных комбинаций не проявляла бактерицидного действия. Все они были устойчивы к колистину (МПК=8-16 мкг/мл) и меропенему (МПК=64-1024 мкг/мл) и являлись продуцентами карбапенемаз ОХА-48 (9 изолятов) и КРС (2 изолята).

Распределение значений МПК меропенема и колистина для 31 изолята *P. aeruginosa*, являющихся продуцентами МБЛ VIM, представлено на Рисунке 4. Чувствительными к колистину были только 48,4% изолятов (МПК<sub>50</sub>=4 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=8 мкг/мл). Все изоляты демонстрировали высокие уровни устойчивости к меропенему (МПК<sub>50</sub>=256 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=512 мкг/мл), чувствительных к нему изолятов не выявлено.

Результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к 11 основным комбинациям АМП представлены на Рисунке 5. Наиболее активными были комбинации

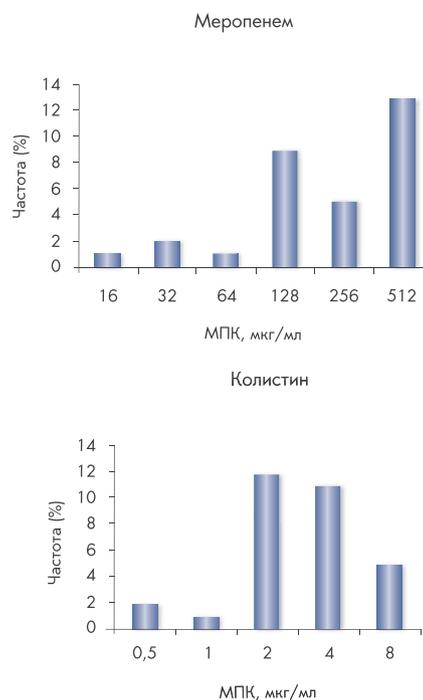


Примечание: МЕР – меропенем, АМК – амикацин, ЛЕВ – левофлоксацин, ТИГ – тигецилин, КОЛ – колистин, ФОС – фосфомицин.

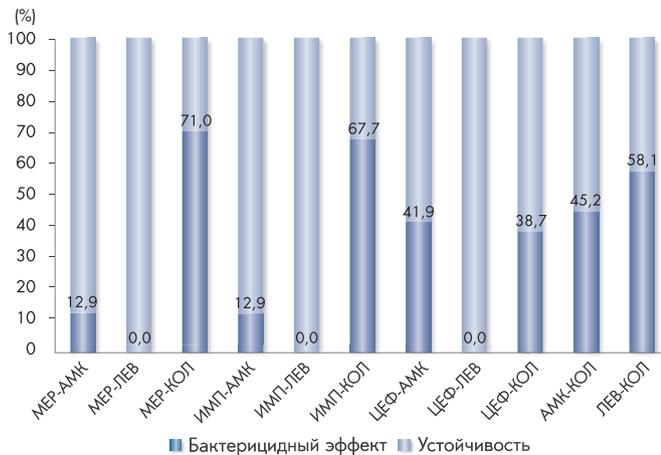
**Рисунок 3.** Эффективность комбинаций из двух АМП в отношении карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*, резистентных (Р) и чувствительных (Ч) к колистину

незначительной (7,4-11,1% чувствительных изолятов), и только комбинация амикацин + колистин действовала бактерицидно на 44,4% изолятов (возможный синергидный эффект).

Несмотря на выявленную у большинства изолятов *K. pneumoniae* чувствительность к тигецилину, все комбинации с его включением не проявляли значимой



**Рисунок 4.** Распределение значений МПК меропенема и колистина для карбапенемазопродуцирующих изолятов *P. aeruginosa*

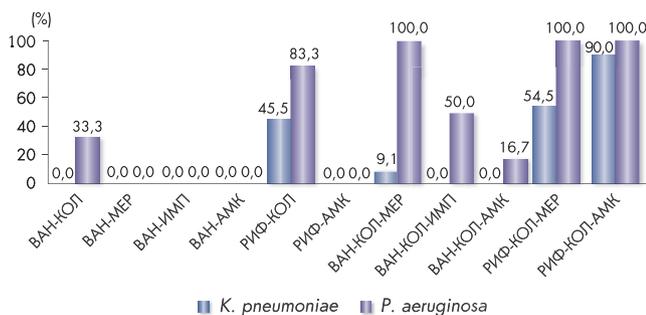


Примечание: МЕР – меропенем, ИМП – имипенем, ЦЕФ – цефтазидим, АМК – амикацин, ЛЕВ – левофлоксацин, КОЛ – колистин

**Рисунок 5.** Эффективность комбинаций из двух АМП в отношении карбапенемазопродуцирующих изолятов *P. aeruginosa*

меропенем + колистин и имипенем + колистин (бактерицидная активность в отношении 71,0% и 67,7% изолятов соответственно). Бактерицидный эффект этих комбинаций проявлялся в том числе и в отношении изолятов, резистентных к колистину (81,3% – для комбинации меропенем + колистин и 50,0% – для комбинации имипенем + колистин). Другие комбинации с колистином проявляли бактерицидную активность в отношении 38,7-58,1% изолятов. Для комбинаций меропенема, имипенема или цефтазидима с левофлоксацином отмечено отсутствие активности в отношении всех изолятов.

В целом, несмотря на высокие индивидуальные значения МПК многих АМП, для большинства включенных в исследование изолятов *P. aeruginosa*, являющихся продуцентами МБЛ VIM, удалось подобрать от 3 до

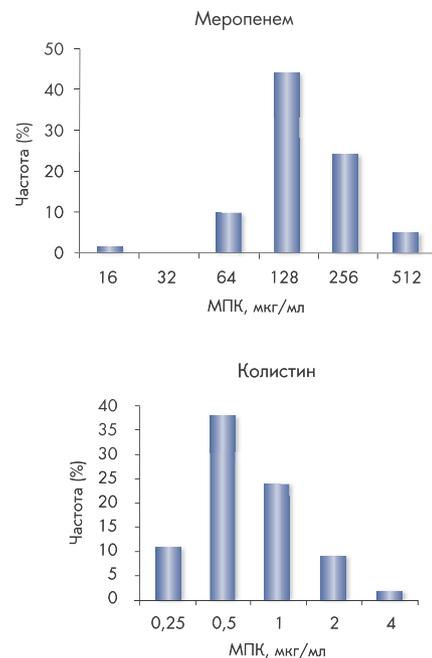


Примечание: ВАН – ванкомицин, КОЛ – колистин, МЕР – меропенем, ИМП – имипенем, АМК – амикацин, РИФ – рифампицин

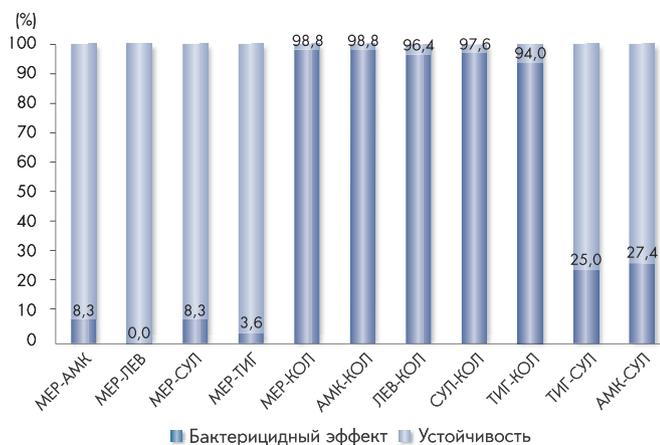
**Рисунок 6.** Эффективность дополнительных комбинаций из двух и трех АМП в отношении карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*

7 комбинаций АМП с бактерицидной активностью. Только в отношении 3 изолятов (9,7%) не проявляла активности ни одна из основных 11 комбинаций, еще 3 изолята были чувствительны только к одной комбинации (меропенем + колистин или имипенем + колистин). Для этих изолятов *P. aeruginosa*, а также для 11 изолятов *K. pneumoniae*, устойчивых ко всем двойным комбинациям АМП, модифицированным методом МСВТ было проведено определение чувствительности к дополнительным двойным и тройным комбинациям АМП, включающим в себя ванкомицин или рифампицин (Таблица 2). Результаты тестирования представлены на Рисунке 6. Комбинации ванкомицин + колистин + меропенем, рифампицин + колистин + меропенем и рифампицин + колистин + амикацин были бактерицидными в отношении всех включенных в дополнительное тестирование изолятов *P. aeruginosa*. Комбинация рифампицин + колистин + амикацин оказывала бактерицидное действие на 90,9% изолятов *K. pneumoniae*, устойчивых ко всем двойным комбинациям АМП из основного набора. Комбинации рифампицин + колистин и рифампицин + колистин + меропенем были бактерицидными соответственно для 45,5% и 54,5% изолятов *K. pneumoniae*. Только для одного изолята *K. pneumoniae* не было обнаружено ни одной комбинации АМП с бактерицидной активностью (продуцент карбапенемазы ОХА-48 с МПК меропенема 128 мкг/мл и МПК колистина 16 мкг/мл, выделен из крови у пациента с посттравматическим остеомиелитом).

Распределение значений МПК меропенема и колистина для 84 изолятов *A. baumannii*, являющихся продуцентами ОХА-карбапенемаз, представлено на Рисунке 7.



**Рисунок 7.** Распределение значений МПК меропенема и колистина для карбапенемазопродуцирующих изолятов *A. baumannii*



Примечание: MER – меропенем, AMK – амикацин, LEV – левофлоксацин, SUL – сульбактам, TIG – тигециклин, KOL – колистин

**Рисунок 8.** Эффективность комбинаций из двух АМП в отношении карбапенемазопродуцирующих изолятов *A. baumannii*

Чувствительными к колистину были 97,6% изолятов (МПК<sub>50</sub>=0,5 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=2 мкг/мл). Все изоляты были устойчивыми к меропенему (МПК<sub>50</sub>=128 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=256 мкг/мл). Чувствительными к сульбактаму (в соответствии с критериями CLSI [32]) были только 14,3% изолятов (МПК<sub>50</sub>=16 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=64 мкг/мл). Чувствительными к тигециклину (в соответствии с критериями EUCAST для энтеробактерий [31]) были 97,6% изолятов (МПК<sub>50</sub>=0,5 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=1 мкг/мл).

Результаты тестирования 11 основных комбинаций АМП в отношении *A. baumannii* представлены на Рисунке 8. Отмечена бактерицидная активность, близкая к 100%, для всех комбинаций с колистином. Как и для *K. pneumoniae*, несмотря на чувствительность к тигециклину у большинства изолятов, комбинации с тигециклином (кроме комбинации тигециклин + колистин) не проявляли значимой бактерицидной активности. Активность всех комбинаций с меропенемом, за исключением комбинации меропенем + колистин, не превышала 8,3%.

## Заключение

Продукция карбапенемаз обуславливала высокие значения МПК меропенема у большинства исследованных изолятов, которые многократно превышали пороговые ФК/ФД концентрации. У части изолятов также была выявлена устойчивость к колистину – препарату резерва для лечения инфекций, вызванных XDR грамотрицательными возбудителями. Нечувствительными к колистину были 42,9% карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*, 51,6% изолятов *P. aeruginosa* и 2,4% изолятов *A. baumannii*. Использование комбинации АМП часто является единственным возможным способом преодолеть экстремальную резистентность возбудителя и обеспечить благоприятный исход заболевания. С помощью модифицированного метода

МСВТ удалось подобрать бактерицидные комбинации АМП для 177 (99,4%) включенных в исследование изолятов, при этом для 155 изолятов (87,1%) обнаружено по 3 и более бактерицидных комбинаций АМП. Наиболее активными были комбинации с колистином, даже для изолятов с МПК колистина выше пороговой ФК/ФД концентрации. Несмотря на низкие уровни резистентности к тигециклину у *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, комбинации с ним, как правило, не проявляли бактерицидной активности, что может быть связано с бактериостатическим действием препарата (тестирование тигециклин-содержащих комбинаций в отношении *P. aeruginosa* не проводилось из-за природной устойчивости к тигециклину у данного возбудителя). Комбинации меропенем + амикацин и амикацин + левофлоксацин были синергидными в отношении более половины колистинорезистентных карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*.

Отмечена универсальная бактерицидная активность (близкая к 100%) всех колистин-содержащих комбинаций в отношении *A. baumannii*, обусловленная, главным образом, малым количеством колистинорезистентных изолятов в исследуемой выборке. В остальных случаях для всех двойных комбинаций АМП выявлена видовая и штаммовая специфичность проявления бактерицидной активности, связанная, возможно, с различиями индивидуальных значений МПК АМП для разных изолятов и сочетанием различных механизмов резистентности. Этот факт обосновывает необходимость определения чувствительности к различным комбинациям АМП для клинических XDR изолятов микроорганизмов, выделенных от конкретных пациентов, с целью назначения им эффективной комбинированной антибиотикотерапии.

Использованная в работе модификация метода МСВТ основывается на тестировании фиксированных концентраций АМП, аналогичных ФК/ФД концентрациям, создающимся в организме при назначении стандартных терапевтических доз. Проводится одновременное тестирование для 11 или 22 различных комбинаций; также возможно тестирование комбинаций, состоящих как из двух, так и из трех АМП. Перечень АМП, включенных в комбинации для тестирования, создан с учетом их доступности на фармацевтическом рынке. Полный цикл исследования с момента получения чистой культуры до оформления микробиологического заключения занимает 72-96 часов. Метод адаптирован для внедрения в практику микробиологических лабораторий организаций здравоохранения.

Требуется проведение дальнейших исследований для оценки клинической и микробиологической эффективности комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных XDR-возбудителями, проводимой с учетом результатов модифицированного метода МСВТ.

## Благодарности

Автор выражает благодарность старшему научному сотруднику ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (Москва) Ю.А. Савочкиной за предоставленные наборы для выявления генов карбапенемаз и за

ведущему научно-исследовательской лабораторией Гомельского государственного медицинского университета О.В. Осипкиной за помощь в организации и проведении молекулярно-генетических исследований.

Исследование выполнялось в рамках задания «Внедрить в практику здравоохранения Гомельской области

систему микробиологического тестирования комбинаций антибиотиков в отношении экстремально антибиотико-резистентных возбудителей бактериальных инфекций», заказчик – Управление здравоохранения Гомельского областного исполнительного комитета, номер государственной регистрации 20164463 от 05.12.2016 г.

## Литература

- Karaiskos I., Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(10):1351-1370.
- Tangden T., Giske C.G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501-512.
- Zavascki A.P., Bulitta J.B., Landersdorfer C.B. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11:1333-1353.
- Cai Y., Chua N.G., Lim T.P., et al. From bench-top to bedside: a prospective *in vitro* antibiotic combination testing (iACT) service to guide the selection of rationally optimized antimicrobial combinations against extensively drug resistant (XDR) Gram negative bacteria (GNB). *PLoS One.* 2016;11(7):e0158740.
- Perez F., El Chakhtoura N.G., Papp-Wallace K.M., Wilson B.M., Bonomo R.A. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply "precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17:761-781.
- Laishram S., Pragasam A.K., Bakthavatchalam Y.D., Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol.* 2017;35(4):445-468.
- Doern C.D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4124-4128.
- NCCLS, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. Document M26-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1999.
- White R.L., Burgess D.S., Manduru M., Bosso J.A. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E-test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1914-1918.
- Manno G., Ugolotti E., Belli M.L., et al. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:28-34.
- Sopirala M.M., Mangino J.E., Gebreyes W.A., et al. Synergy testing by etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4678-4683.
- Tapalski D.V. Bacteriophage preparations and combinations of antibiotics: *in vitro* activity in regard to extensively drug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* ST235. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2016;18(4):242-248. Russian. (Тапальский Д.В. Препараты бактериофагов и комбинации антибиотиков: *in vitro* активность в отношении изолятов *Pseudomonas aeruginosa* ST235 с экстремальной антибиотико-резистентностью. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016;18(4):242-248.)
- Tripodi M.F., Durante-Mangoni E., Fortunato R., Utili R., Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30:537-540.
- Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A., Speert D.P., Macdonald N.E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Resp Crit Care Med.* 2000;161(4):1206-1212.
- Lang B.J., Aaron S.D., Ferris W., Hebert P.C., MacDonald N.E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2241-2245.
- Foweraker J.E., Laughton C.R., Brown D.F., Bilton D. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4809-4815.
- Saiman L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. *Paediatr Respir Rev.* 2007;8(3):249-255.
- Waters V., Ratjen F. Combination antimicrobial susceptibility testing for acute exacerbations in chronic infection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;6:CD006961.
- Mezzatesta M.L., Caio C., Gona F., et al. Colistin increases the cidal activity of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: an *in vitro* model comparing multiple combination bactericidal testing at one peak serum concentration and time-kill method. *Microb Drug Resist.* 2016;22(5):360-363.
- Teo J., Lim T.P., Hsu L.Y., et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Thai hospital: a molecular epidemiologic analysis and identification of bactericidal polymyxin B-based combinations. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015;4(1):2.
- Aaron S.D., Vandemheen K.L., Ferris W., et al. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, doubleblind, controlled clinical trial. *Lancet.* 2005;366(9484):463-471.
- Flume P.A., Mogayzel P.J., Robinson K.A., et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am J Resp Crit Care Med.* 2009;180:802-808.
- Mydin H.H., Corris P.A., Nicholson A., et al. Targeted antibiotic prophylaxis for lung transplantation in cystic fibrosis patients colonised with *Pseudomonas aeruginosa* using multiple combination bactericidal testing. *J Transplant.* 2012;2012:135738.
- Tapalski D.V., Lagun L.V. Methods for determining sensitivity to combinations of antibiotics of Gram-negative bacteria with extensively drug resistance and pandrug resistance. Instructions for use. Ministry of Health of the Republic of Belarus, 2017. Registration number 002-0517. Russian. (Тапальский Д.В., Лагун Л.В. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью. Инструкция по применению. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. 2017. Регистрационный № 002-0517.)
- Tapalski D.V., Osipov V.A., Yevseyenko E.O., et al. Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extensively antibiotic-resistant enterobacteria: occurrence in Belarus. *Zdravoohranenie.*

- 2017;3:40-47. Russian. (Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О. и соавт. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси. Здравоохранение. 2017;3:40-47.).
26. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditsinskii zhurnal*. 2012;2(40):10-15. Russian. (Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. Медицинский журнал. 2012;2(40):10-15.).
27. Tapalski D.V., Bonda N.A., Lagun L.V. Microbiological monitoring system of extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacterial pathogens determining the sensitivity to antibiotic combinations. *Vestnik of Vitebsk State Medical University*. 2018;17(1):50-58. Russian. (Тапальский Д.В., Бонда Н.А., Лагун Л.В. Система микробиологического мониторинга экстремально-антибиотикорезистентных и панрезистентных бактериальных патогенов с определением чувствительности к комбинациям антибиотиков. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2018;17(1):50-58.).
28. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2573-2582.
29. Chew K.L., La M.V., Lin R.T.P., Teo J.W.P. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2609-2616.
30. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» – Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
31. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 8.0 2018. Available at: [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).
32. CLSI, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.