

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 579.61:615.33-043.5(043.3)

**ПЕТРОВСКАЯ**  
**Татьяна Александровна**

**ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
КОЛИСТИНА АНТИБИОТИКАМИ РАЗНЫХ ГРУПП**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск, 2022

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гомельский государственный медицинский университет»

**Научный руководитель:** **Тапальский Дмитрий Викторович**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Жаворонок Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры инфекционных болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Тонко Оксана Владимировна**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

**Оппонирующая организация:** Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 2 декабря 2022 года в 11.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, тел. (+375 17) 302 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ ноября 2022 года.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций Д 03.18.04,  
кандидат медицинских наук, доцент



А.П.Музыченко

## ВВЕДЕНИЕ

Устойчивые к карбапенемам штаммы *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также устойчивые к карбапенемам и цефалоспорином третьего поколения энтеробактерии включены Всемирной организацией здравоохранения в группу наивысшего приоритета для проведения исследований и разработки новых антибиотиков [Tascopelli E., 2017]. Широкое использование полимиксинов для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам грамотрицательными бактериями, привело к появлению и распространению колистинорезистентных штаммов *P.aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* со сформировавшимся состоянием панрезистентности [Stefaniuk E. M., 2019; Li Z., 2019].

Устойчивость к полимиксинам связана с точечными мутациями и хромосомными перестройками, которые приводят к изменениям структуры липополисахарида и ослаблению его электростатического взаимодействия с антибиотиком [Cheng H. Y., 2010; Poirel L., 2015]. Приобретение плазмидных генов *mcr* является важной причиной устойчивости к полимиксинам у энтеробактерий [Liu Y. Y., 2016; Mulvey M. R., 2016]. Развитие мутационной устойчивости к антибиотикам имеет определенную биологическую стоимость и часто сопровождается снижением вирулентности и конкурентоспособности [Melnyk A. H., 2015]. Сведения о биологической стоимости устойчивости к полимиксинам у *K.pneumoniae* немногочисленны и противоречивы [Nang S. C., 2018; Wang R., 2018].

При терапии инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам возбудителями, использование комбинированной антибиотикотерапии часто является единственно возможным способом лечения [Zavascki, A. P., 2013]. Данные тестирования *in vitro* комбинаций полимиксинов с другими антибиотиками демонстрируют синергидную активность для многих комбинаций [Scudeller L., 2021]. Показано, что комбинирование полимиксинов с тетрациклинами и рифампицином приводит к существенному сокращению формирования *in vitro* устойчивых к полимиксинам мутантов *A.baumannii* [Nordqvist H., 2016]. Сочетание различных механизмов устойчивости не позволяет надежно прогнозировать эффективность комбинаций антибиотиков. Использование индивидуализированной антибиотикотерапии, выбранной на основе результатов тестирования комбинации *in vitro*, в сравнении с эмпирически назначаемой комбинированной антибиотикотерапией значительно увеличивает выживаемость пациентов с инфекциями, вызванными экстремально-антибиотикорезистентными грамотрицательными бактериями [Cai B., 2016; Vardakas K. Z., 2019].

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными программами, темами

Работа выполнялась в рамках следующих финансируемых научных проектов и тем, исполнителем которых являлся автор настоящего диссертационного исследования:

– задание «Внедрить в практику здравоохранения Гомельской области систему микробиологического тестирования комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных возбудителей бактериальных инфекций», заказчик – Гомельский областной исполнительный комитет, договор № 30/08, № госрегистрации 20164463, срок выполнения 01.09.2016 – 31.12.2018 гг.

– задание «Изучение биологических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости к полимиксидам у экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий и обоснование комбинированной антибиотикотерапии вызываемых ими инфекций» ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», № госрегистрации 20200311 от 12.03.2020, срок выполнения 01.01.2020 – 30.06.2021 гг.

**Цель исследования:** Выявление антибиотиков, способных потенцировать бактерицидную активность колистина в отношении устойчивых к нему штаммов и экспериментальное обоснование методов комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных колистинорезистентными микроорганизмами.

### Задачи исследования:

1. Определить минимальные подавляющие концентрации (МПК) колистина для XDR и PDR штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* методом последовательных разведений в бульоне и провести валидацию различных методов прямого определения МПК колистина.

2. Определить фракционные подавляющие концентрации колистина в присутствии антибиотиков различных групп и выявить комбинации антибиотиков, оказывающие синергидное действие на колистинорезистентные XDR и PDR штаммы *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*.

3. Оценить частоту возникновения мутаций *in vitro* и определить минимальные концентрации колистина, предотвращающие появление мутационной резистентности. Оценить биологическую стоимость мутационной резистентности.

4. С использованием высокопроизводительного секвенирования оценить генетические механизмы формирования устойчивости к полимиксидам у

клинических изолятов *K.pneumoniae* и лабораторных колистинорезистентных мутантов.

**Объект исследования:** клинические изоляты *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* с различными уровнями устойчивости к полимиксидам и другим антибиотикам, лабораторные колистинорезистентные мутанты *K.pneumoniae*.

**Предмет исследования:** резистентность к колистину, генетические механизмы ее формирования и биологическая стоимость; синергидная активность комбинаций антибиотиков в отношении колистинорезистентных штаммов.

### **Научная новизна**

Впервые оценено потенцирование антибактериальной активности колистина фиксированными фармакокинетическими / фармакодинамическими концентрациями антибиотиков различных групп в отношении множественно-антибиотикорезистентных и экстремально-антибиотикорезистентных штаммов грамотрицательных бактерий.

Впервые определены минимальные концентрации колистина, предотвращающие возникновение мутационной резистентности у госпитальных изолятов *K.pneumoniae*, выделенных в Беларуси, и показана способность ряда антибиотиков (кларитромицина, рифампицина, доксициклина) препятствовать образованию колистинорезистентных мутантов.

Впервые в Беларуси определены молекулярно-генетические механизмы устойчивости к колистину клинических изолятов *K.pneumoniae* и колистинорезистентных лабораторных мутантов.

Впервые показано отсутствие биологической стоимости мутационной устойчивости к колистину у карбапенемазопродуцирующих колистинорезистентных лабораторных мутантов *K.pneumoniae*.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Метод элюции колистина из дисков в бульон (colistin broth disk elution, CBDE) и тестирование с использованием планшетов Sensititre позволяют получать воспроизводимые значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) колистина для *K.pneumoniae*, которые хорошо согласуются с результатами референсного метода микроразведений в бульоне. Замена субстанции колистина стандартными дисками делает метод CBDE доступным для рутинного использования в микробиологических лабораториях.

2. В присутствии фиксированной фармакокинетической/фармакодинамической (ФК/ФД) концентрации кларитромицина отмечен эффект снижения МПК колистина для 85,2% штаммов *K.pneumoniae*, 86,3% штаммов *A.baumannii* и 60,2% штаммов *P.aeruginosa*. Для

колистинорезистентных штаммов *K.pneumoniae* добавление фиксированной ФК/ФД концентрации кларитромицина позволило восстановить чувствительность к колистину (снизить МПК колистина до или ниже порогового значения 2 мг/л) у 81,4% штаммов, добавление азитромицина – у 35,5% штаммов, добавление рифампицина – у 100% штаммов.

3. Значения минимальных концентраций колистина, предотвращающих селекцию резистентных мутантов *K.pneumoniae* (МПК<sub>М</sub>), находятся в диапазоне 16–256 мг/л, что значительно выше клинически достижимых сывороточных концентраций колистина. В присутствии фиксированных ФК/ФД концентраций кларитромицина, азитромицина, рифампицина, доксицилина происходит значительное (в 4-64 раза) снижение МПК<sub>М</sub> колистина. Меропенем в фиксированной ФК/ФД концентрации не оказывает значимого влияния на МПК<sub>М</sub> колистина у карбапенемазопродуцирующих штаммов.

4. Устойчивость к колистину у клинических изолятов *K.pneumoniae* и лабораторных колистинорезистентных мутантов связана с инсерционной инактивацией и делециями гена *mgrB*, а также функционально значимыми заменами D150Y, T157P и G207S в гене сенсорной киназы *pmrB*.

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Соискателем совместно с научным руководителем обозначены проблема и направления исследования, определены тема, цель и задачи исследования, выполнено планирование основных этапов, проанализированы результаты работы. Автором лично проведен анализ научной литературы, создана и систематизирована рабочая коллекция микроорганизмов, выполнено определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и их комбинациям, определение фракционных подавляющих концентраций колистина в присутствии антибиотиков различных групп, определение частоты мутационной резистентности и гетерорезистентности, определение минимальных концентраций антибиотиков, предупреждающих селекцию антибиотикорезистентных мутантов, биоинформатический анализ, статистическая обработка результатов, подготовка рукописи диссертационного исследования, внедрение результатов исследования в практику здравоохранения.

Большинство публикаций написаны автором в соавторстве с научным руководителем. Среди других соавторов – сотрудники научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет», лаборатории генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса Национальной академии наук Беларуси», НИИ

антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, которые оказывали помощь в выполнении молекулярно-генетических исследований (детекция генов карбапенемаз и фосфоэтаноламинтрансфераз, высокопроизводительное секвенирование геномов клинических изолятов и лабораторных колистинорезистентных мутантов *K.pneumoniae*). Суммарное долевое участие соискателя в публикациях составляет 70%, в инструкции по применению – 50%.

### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты исследования и основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «XXIV Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург 2021); ежегодной конференции Ассоциации по медицинской микробиологии и инфекционным болезням Канады «АММИ Canada SACMID 2021» (Ванкувер 2021); межвузовской научно-практической конференции «Актуальные вопросы микробиологии, иммунологии и инфектологии» (Гродно, 2021); республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (Минск, 2021).

Результаты исследования внедрены в работу микробиологической лаборатории ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет», отделения инфекционного контроля ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», в учебный процесс кафедры инфекционных болезней и детских инфекций ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования». Нуклеотидные последовательности геномов бактерий *K.pneumoniae* 37999, БК-045, БК-168, МК-07 депонированы в базу данных GenBank NCBI, коды доступа SAMN19229828, SAMN19244166, SAMN19244622, SAMN19243501. Депонированы в Республиканскую коллекцию патогенных биологических агентов ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» 6 экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолятов *K.pneumoniae* и 2 изогенных штамма лабораторных колистинорезистентных мутантов *K.pneumoniae*.

### **Опубликование результатов диссертации**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 7 статей в рецензируемых журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике

Беларусь» (общий объем 4,9 авторских листа), включая 4 статьи в журналах Российской Федерации; 6 других публикаций (1 статья и 5 тезисов докладов в журналах и сборниках научных трудов, общий объем 0,9 авторских листа). По результатам диссертации Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена 1 инструкция по применению (0,5 авторских листа). Общий объем опубликованных материалов – 6,3 авторских листа.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного текста, состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав (обзор литературы, материалы и методы, 4 глав результатов собственных исследований), заключения, библиографического списка и 4 приложений. Объем содержательной части диссертации составил 111 страниц, включая 21 таблицу (объем – 12 страниц) и 27 рисунков (объем – 14,5 страниц). Библиографический список включает 149 источников, из которых 4 русскоязычных и 145 иностранных, а также 14 собственных публикаций соискателя.

Приложения включают удостоверения о депонировании штаммов микроорганизмов, инструкцию по применению, акты внедрения результатов диссертационного исследования.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материалы и методы исследования**

Из рабочей коллекции отобрано 272 штамма грамотрицательных бактерий с множественной (MDR – multidrug resistance) или экстремальной (XDR – extensively drug resistance) устойчивостью к антибиотикам. Критерием включения в исследование являлось наличие устойчивости к карбапенемам (имипенему и/ или меропенему). Все штаммы были выделены в 2015–2019 гг. от госпитализированных пациентов в организациях здравоохранения Гомеля и районных центров Гомельской области (235 штаммов), а также Минска (24 штамма) и Витебска (13 штаммов). В их числе 128 MDR и XDR штаммов *K.pneumoniae*, 51 MDR штамм *A.baumannii* и 93 MDR и XDR штамма *P.aeruginosa*. В исследование также включены 3 контрольных штамма из Американской коллекции типовых культур микроорганизмов (ATCC) и 3 контрольных штамма из коллекции микроорганизмов НИИ антимикробной химиотерапии (Смоленск, Российская Федерация).



Определение чувствительности *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *K.pneumoniae* к 17 антибиотикам (ампициллину/сульбактаму, пиперациллину, цефуроксиму, цефуроксим аксетилю, цефиксиму, цефтриаксону, цефепиму, азтреонаму, меропенему, левофлоксацину, моксифлоксацину, миноциклину, тетрациклину, тигециклину, хлорамфениколу, колистину, триметоприму) проводилось на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция) с применением диагностических карт AST-XN-05. В качестве референсного метода использовали метод последовательных микроразведений в бульоне, регламентированный ISO 20776-1:2006. Также определяли МПК колистина при помощи коммерческой системы Sensititre (Thermo Scientific, США) на планшетах FRCOL и модифицированным методом разведений в бульоне с использованием в качестве источника колистина стандартных дисков (Colistin broth disk elution, CBDE). Молекулярно-генетическое исследование с целью определения генов карбапенемаз проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени», тест-системы «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Российская Федерация). Для определения типа фармакодинамических взаимодействий колистина с антибиотиками разных групп использовали диско-диффузионный метод, метод серийных разведений в присутствии фиксированных концентраций антибиотиков других групп, метод «шахматной доски». Для определения частоты возникновения устойчивости к колистину *in vitro* использовался метод A. Oliver et al. Для дифференцировки мутационной устойчивости к колистину от гетерорезистентности для полученных резистентных штаммов выполняли исследование, аналогичное популяционному профилированию (PAP – population analysis profile). Минимальную концентрацию колистина, предотвращающую селекцию резистентных мутантов (mutant prevention concentration, МПК<sub>М</sub>), определяли модифицированным методом, описанным Y. Cai et al. При помощи метода серийных разведений в агаре определяли минимальные концентрации колистина, предотвращающие селекцию резистентных мутантов, в присутствии фиксированных ФК/ФД концентраций различных антибиотиков. Выявление фрагментов генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* микроорганизмов проводили методом ПЦР с последующей электрофоретической детекцией, верификация проведена методом секвенирования по Сэнгеру. Полупроводниковое секвенирование выполняли в геномном секвенаторе Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием микрочипов Ion 314 Chip v2, Ion 318 Chip v2 и набора Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки биологической стоимости устойчивости к колистину проводили сравнение кинетических характеристик роста в бульонной культуре для исходных колистиночувствительных штаммов (wild type, WT) и полученных из них колистинорезистентных мутантов ( $mut_{16}$ ). Инкубацию и учет результатов выполняли на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan, Австрия). Рассчитывали продолжительность лаг-периода S-образной кривой ( $T_{lag}$ ), время удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ( $T_{doubling}$ ), площадь под кривой бактериального роста (AUC, area under curve).

Статистическая обработка данных, графическая обработка результатов исследований выполнены с использованием пакета Prism 8.3 (GraphPad Software Inc.), R Studio 4.1.1 (GNU GPL 2). Значимость различий сравниваемых групп определялась: для независимых групп с помощью U-теста Манна — Уитни, для связанных групп с помощью рангового T-критерия Уилкоксона. В случае сравнения трех и более групп применялся критерий Краскела — Уоллиса (независимые группы) и критерий Фридмана (связанные группы) с последующим апостериорным сравнением. Для изучения связи между явлениями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

## Результаты исследования

### **Чувствительность к колистину клинических изолятов *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* и валидация методов ее определения**

Все включенные в исследование штаммы являлись множественно- или экстремально-антибиотикорезистентными, устойчивость к карбапенемам (МПК меропенема  $>8$  мг/л) подтверждена для всех штаммов. У всех исследуемых штаммов *K.pneumoniae* присутствовали гены карбапенемаз ( $bla_{OXA-48}$  – у 63,3% штаммов,  $bla_{NDM}$  – у 23,4% штаммов,  $bla_{KPC}$  – у 11,7% штаммов,  $bla_{OXA-48} + bla_{NDM}$  – у 1,6% штаммов). У всех штаммов *A.baumannii* выявлены гены OXA-карбапенемаз ( $bla_{OXA-23}$  – у 3,9% штаммов,  $bla_{OXA-40}$  – у 94,1% штаммов,  $bla_{OXA-23} + bla_{OXA-40}$  – у 2,0% штаммов). Наличие генов карбапенемаз  $bla_{VIM}$  выявлено у 9,7% штаммов *P.aeruginosa*. Устойчивость к колистину (МПК  $> 2$  мг/л) выявлена у 33,6% штаммов *K.pneumoniae* и 1,1% штаммов *P.aeruginosa*, не выявлено штаммов *A.baumannii*, устойчивых к колистину.

Результаты определения МПК колистина, полученные с использованием планшетов Sensititre ( $R_{sp}=0,92$ ;  $p<0,001$ ) и методом CBDE ( $R_{sp}=0,8$ ;  $p<0,001$ ), хорошо коррелировали с результатами референтного метода во всем диапазоне концентраций. Категориальное соответствие с

референтным методом отмечено для 93,5% результатов, полученных с использованием Sensititre и 96,8% результатов, полученных методом CBDE. Существенное соответствие (совпадение значений МПК или отличие на  $\pm 1$  разведение) отмечено для 93,5–100% результатов (таблица 1).

Таблица 1. – Сопоставление результатов определения МПК колистина на планшетах Sensititre и методом CBDE с референтным методом последовательных микроразведений в бульоне

Категория соответствия		Sensititre	CBDE
Существенное соответствие (EA)	n	58	22*
	%	93,5	100,0*
Категориальное соответствие (CA)	n	58	60
	%	93,5	96,8
Большое расхождение (MD)	n	0	0
	%	0,0	0,0
Очень большое расхождение (VMD)	n	4	2
	%	6,5	3,2

\* Рассчитано только для штаммов с МПК колистина в диапазоне 1-4 мг/л.

Все результаты определения МПК колистина для контрольных штаммов *E.coli* ATCC 25922 и *P.aeruginosa* ATCC 27853, полученные референтным методом и методом CBDE (с дополнительным тестированием концентраций колистина 0,25 мг/л и 0,5 мг/л) соответствовали целевым значениям. При использовании планшетов Sensititre соответствовали целевым значениям 5 результатов определения МПК, 1 результат находился в допустимом диапазоне (таблица 2).

Таблица 2. – Результаты определения МПК колистина для контрольных штаммов

Метод определения МПК колистина	<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853			
	0,25*	0,5**	1**	2*	0,5*	1**	2**	4*
Референтный метод	-	-	3	-	-	-	3	-
Sensititre	-	-	2	1	-	-	3	-
CBDE	-	1	2	-	-	2	1	-

\*- допустимые значения МПК (мг/л); \*\*- целевые значения МПК (мг/л)

### **Чувствительность антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий к комбинациям антибиотиков**

Методом микроразведений в бульоне Мюллер-Хинтон выполнено определение МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации различных антибиотиков. Наиболее выраженное потенцирующее действие на антибактериальную активность колистина отмечено для рифампицина

(снижение МПК колистина в 4 или более раз отмечено для всех включенных в исследование штаммов, для всех штаммов достигнуто целевое значение МПК колистина 2 мг/л, соответствующее его ФК/ФД-концентрации. Клиндамицин и линезолид значительно потенцировали активность колистина в отношении только 9,7% и 6,5% штаммов (таблица 3). В присутствии азитромицина отмечено снижение МПК колистина в 4 или более раз для 45,2% штаммов, для 35,5% штаммов МПК колистина снижалась до 2 мг/л.

Таблица 3. – Потенцирующее действие фиксированных концентраций антибиотиков различных групп на антибактериальную активность колистина

Антибиотик, концентрация	Снижение МПК колистина в 4 или более раз, % штаммов	Достижение целевого МПК колистина 2 мг/л, % штаммов	$\log_2$ ФП
Рифампицин, 2 мг/л	100,0	100,0	7,65±0,38
Клиндамицин, 0,5 мг/л	32,3	9,7	1,23±0,52
Меропенем, 8 мг/л	38,7	12,9	2,00±0,54
Линезолид, 2 мг/л	6,5	6,5	0,84±0,47
Азитромицин, 1 мг/л	45,2	35,5	2,97±0,62
Меропенем, 8 мг/л + линезолид, 2 мг/л	45,2	22,6	2,32±0,52
Меропенем, 8 мг/л + азитромицин, 1 мг/л	54,8	41,9	3,58±0,62

Для колистинорезистентных штаммов *K.pneumoniae* добавление фиксированной ФК/ФД концентрации кларитромицина позволило восстановить чувствительность к колистину (снизить МПК колистина до или ниже порогового значения 2 мг/л) у 81,4% штаммов (рисунок 1).

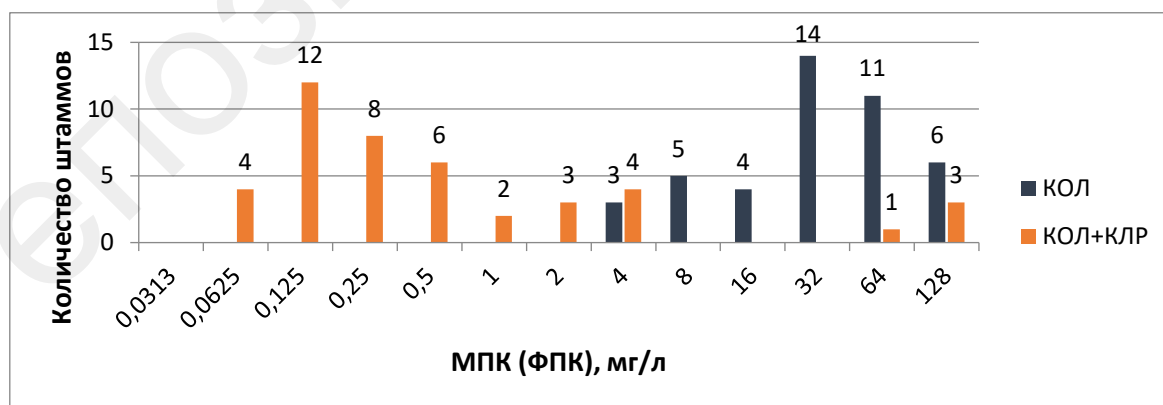


Рисунок 1. – Распределение МПК колистина и ФПК колистина в присутствии фиксированной концентрации кларитромицина (1 мг/л) в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*, устойчивых к колистину (n=43)

Синергидная активность комбинации колистина с макролидами подтверждена методом «шахматной доски». Индексы ФПК комбинации колистина с кларитромицином составили 0,023–0,094 для *K.pneumoniae*, 0,266–0,508 для *A.baumannii* и *P.aeruginosa*.

### Мутационная резистентность и гетерорезистентность к колистину, биологическая стоимость мутационной резистентности

Способность к формированию колистинорезистентных субпопуляций выявлена для 97,8% штаммов *K.pneumoniae*, 16,9% штаммов *P.aeruginosa* и 61,9% штаммов *A.baumannii*. По результатам популяционного профилирования мутационная природа устойчивости к колистину подтверждена для 21,7% штаммов *K.pneumoniae*, 2,6% штаммов *P.aeruginosa*, 4,8% штаммов *A.baumannii*, остальные случаи возникновения устойчивых субпопуляций были интерпретированы как проявление гетерорезистентности. Достигнутые значения МПК колистина резистентных мутантов *K.pneumoniae* значительно превышали концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась их селекция (таблица 4). Так, 7 из 10 мутантных штаммов имели МПК колистина  $\geq 512$  мг/л, что в 512 и более раз превышало МПК колистина изогенных чувствительных штаммов.

Таблица 4. – Частота возникновения мутационной устойчивости к колистину у *K.pneumoniae* и МПК колистина изогенных чувствительных штаммов и колистинорезистентных мутантов

Штамм	Город	Частота возникновения мутационной устойчивости	МПК колистина, мг/л	
			WT	mut <sub>16</sub>
БК-039	Гомель	$5 \cdot 10^{-7}$	1	128
БК-080	Жлобин	$3 \cdot 10^{-7}$	1	$\geq 512$
БК-104	Гомель	$2 \cdot 10^{-7}$	1	$\geq 512$
БК-111	Гомель	$10^{-6}$	1	$\geq 512$
БК-114	Жлобин	$3 \cdot 10^{-7}$	0,5	64
БК-117	Светлогорск	$6 \cdot 10^{-8}$	1	$\geq 512$
БК-123	Жлобин	$2 \cdot 10^{-7}$	0,5	$\geq 512$
БК-148	Гомель	$6 \cdot 10^{-8}$	1	32
БК-153	Гомель	$4 \cdot 10^{-7}$	1	$\geq 512$
В-377	Витебск	$3 \cdot 10^{-7}$	0,5	$\geq 512$

Значения минимальных концентраций колистина, предотвращающих селекцию резистентных мутантов (МПК<sub>М</sub>) находились в диапазоне 16–32 мг/л, что значительно (в 32–64 раза) превосходило значения МПК колистина включенных в исследование штаммов. В присутствии кларитромицина (2 мг/л), азитромицина (2 мг/л), рифампицина (1 мг/л), клиндамицина (0,5 мг/л),

доксциклина (2 мг/л) значения МПК<sub>М</sub> колистина снижались до 4–8 мг/л для всех штаммов. Присутствие линезолида (2 мг/л) и ванкомицина (2 мг/л) значимо не изменяло МПК<sub>М</sub> колистина. Ни один из включенных в исследование антибиотиков не снижал МПК<sub>М</sub> колистина до его ФК/ФД концентрации 2 мг/л. Меропенем в концентрации 8 мг/л не оказывал значимого влияния на МПК<sub>М</sub> колистина у карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*.

Биологическая стоимость резистентности у колистинорезистентных лабораторных мутантов *K.pneumoniae* проявлялась увеличением продолжительности лаг-периода (таблица 5). Показатели времени удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ( $T_{doubling}$ ) и площади под кривой бактериального роста (AUC) не имели значимых отличий. Для 8 из 10 штаммов *K.pneumoniae* mut<sub>16</sub> отмечалось сокращение показателя  $T_{doubling}$ , связанное с увеличением скорости размножения в экспоненциальной стадии роста в сравнении с изогенными WT-штаммами.

Таблица 5. – Параметры бактериального роста колистиночувствительных штаммов *K.pneumoniae* и колистинорезистентных мутантов

Кинетический параметр	Группа штаммов	Значения	p(WT-mut16)
Tlag (мин)	WT	225,6±7,0	0,037
	mut <sub>16</sub>	245,5±8,7	
T <sub>doubling</sub> (мин)	WT	32,2±0,5	0,065
	mut <sub>16</sub>	30,9±0,8	
AUC	WT	20444±1159	0,77
	mut <sub>16</sub>	19361±677	

В целом интенсивность размножения исходных штаммов и изогенных колистинорезистентных мутантов была сопоставимой, что позволяет прогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину и ее сохранение в микробных популяциях *K.pneumoniae* даже в случае значительного сокращения потребления антибиотика.

#### Генетические механизмы устойчивости к колистину

Устойчивость к колистину у колистинорезистентных штаммов *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa* не была связана с наличием плазмидно-опосредованных генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*. По результатам анализа, выполненного в системах поиска генетических детерминант антибиотикорезистентности ResFinder v4.1 и CARD, гены плазмидно-опосредованных фосфоэтаноламинтрансфераз *mcr* отсутствовали.

В ходе сопоставления последовательностей генов *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ* исследованных образцов с референсным штаммом *K. pneumoniae* ATCC 700603, выявлено наличие ряда несинонимичных однонуклеотидных замен

(SNP), не приводящих к изменению функциональной активности продуктов трансляции. Так, в гене *phoP* всех штаммов присутствовал полиморфизм, приводящий к замене лизина на аргинин в 34-й позиции (K34R). Ген *pmrA*, всех исследуемых штаммов отличался от референсной последовательности пятью несинонимичными нуклеотидными заменами, приводящими к заменам аминокислот A64S, D131N, Q140L, D199E, H219N. Только замена Q140L была маркирована программой PROVEAN как влияющая на функциональную активность белка, однако она присутствовала как у колистиночувствительных, так и у колистинорезистентных штаммов. В гене *phoQ* всех штаммов присутствовали одинаковые замены, не влияющие на функциональную активность белка: K64R, K92Q, T106A, D112E, V139I, F163L, I196V, S372T, P424Q, L482Q, E487Q. Выявлен ряд функционально значимых замен в гене *pmrB*, присутствующих только у колистинорезистентных штаммов: D150Y, T157P, G207S. Последовательности гена *mgrB* всех колистиночувствительных штаммов не отличались от референсных. У колистинорезистентного штамма *K.pneumoniae* БК-168 (МПК колистина 128 мг/л) в *mgrB* присутствовала функционально значимая замена W20R. Еще у 4 штаммов устойчивость к колистину была вызвана инсерционной инактивацией генов *K. pneumoniae* транспозонами семейств IS1, IS4 и IS5. У двух колистинорезистентных штаммов не удалось выявить значимые механизмы устойчивости в анализируемых генах.

Для изогенных штаммов *K.pneumoniae* БК-104 и *K.pneumoniae* БК-104\_МУТ16 не выявлено отличий в структуре генов *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* (таблица 6).

Ген *mgrB* у лабораторного мутанта *K.pneumoniae* БК-104\_МУТ16 был делетирован, что привело к увеличению МПК колистина с 1 мг/л до 512 мг/л. Делеция гена *mgrB* являлась комплексной и также затрагивала фланкирующие его локусы. Общий размер делетированного участка составил 1356 п.н., и наряду с *mgrB*, включал в своем составе локус *YobH* и фрагменты локусов *kdgR* и *YebO*.

Для изогенных штаммов *K.pneumoniae* БК-148 и *K.pneumoniae* БК-148\_МУТ16 структура гена *mgrB* соответствовала дикому типу (WT). Также не выявлено отличий в структуре генов *pmrA*, *phoP*, *phoQ*. Лабораторный колистинорезистентный мутант отличался от исходного колистиночувствительного штамма наличием значимой замены T157P в гене *pmrB*, которая также была выявлена у колистинорезистентного клинического изолята *K.pneumoniae* 37999.

Таблица 6. – Минимальные подавляющие концентрации колистина и несинонимичные мутации в генах устойчивости к колистину у изогенных штаммов *K.pneumoniae* БК-104 и *K.pneumoniae* БК-104\_МУТ16, *K.pneumoniae* БК-148 и *K.pneumoniae* БК-148\_МУТ16

Штамм	МПК колистина, мг/л	<i>mgrB</i>	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>
БК-104	1	структура аналогична референсному генотипу ATCC 700603	<u>Q140L</u>	<u>R256G</u>		
БК-104_МУТ16	512	делетирован	<u>Q140L</u>	<u>R256G</u>		
БК-148	1	структура аналогична референсному генотипу ATCC 700603	<u>Q140L</u>			
БК-148_МУТ16	32	структура аналогична референсному генотипу ATCC 700603	<u>Q140L</u>	<u>T157P</u>		

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Множественная и экстремальная антибиотикорезистентность ассоциирована с продукцией карбапенемаз (МБЛ VIM у штаммов *P.aeruginosa*, МБЛ NDM, KPC и OXA-48 у *K.pneumoniae*, OXA-23 и OXA-40 у *A.baumannii*). Часть карбапенеморезистентных штаммов *K.pneumoniae* и отдельные штаммы *P.aeruginosa* имели устойчивость к полимиксинам (МПК колистина >2 мг/л). Более половины колистинорезистентных штаммов имели высокие уровни устойчивости (МПК колистина 32-128 мг/л). [1, 2, 8].

2. Показано, что метод CBDE и метод микроразведений в планшетах Sensititre позволяют получать воспроизводимые результаты МПК колистина для *K.pneumoniae*, которые хорошо согласуются с результатами референсного метода микроразведений в бульоне. Категориальное соответствие с референтным методом отмечено для 93,5% результатов, полученных с использованием Sensititre и 96,8% результатов, полученных методом CBDE. Существенное соответствие (совпадение значений МПК или отличие на  $\pm 1$  разведение) отмечено для 93,5–100% результатов. Замена субстанции колистина стандартными дисками делает метод CBDE доступным для рутинного использования в микробиологических лабораториях [6].



3. Эффект снижения МПК колистина в присутствии 1 мг/л кларитромицина отмечен для 85,2% штаммов *K.pneumoniae*, 86,3% штаммов *A.baumannii* и 60,2% штаммов *P.aeruginosa*. Для колистинорезистентных штаммов *K.pneumoniae* добавление фиксированной концентрации кларитромицина позволило восстановить чувствительность к колистину (снизить МПК колистина до или ниже порогового значения 2 мг/л) для 81,4% штаммов, азитромицина – для 35,5% штаммов, рифампицина – для 100% штаммов. Полученные результаты открывают перспективы для клинического использования альтернативных схем комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных колистинорезистентными XDR и PDR штаммами *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, основанных на включении антибиотиков, не способных в обычных условиях проникать через наружную мембрану в цитоплазму грамотрицательных микроорганизмов. Доступ указанных антибиотиков к внутриклеточным мишеням открывается в присутствии даже небольших концентраций колистина, часто не превышающих его ФК/ФД концентрации, а эффект комбинированного воздействия проявляется даже в отношении колистинорезистентных штаммов с высокими значениями МПК [2, 3, 9, 11].

4. Способность к формированию колистинорезистентных субпопуляций выявлена для 97,8% штаммов *K.pneumoniae*, 16,9% штаммов *P.aeruginosa* и 61,9% штаммов *A.baumannii*. По результатам популяционного профилирования мутационная природа устойчивости к колистину подтверждена для 21,7% штаммов *K.pneumoniae*, 2,6% штаммов *P.aeruginosa*, 4,8% штаммов *A.baumannii*, остальные случаи возникновения устойчивых субпопуляций были интерпретированы как проявление гетерорезистентности. Достигнутые значения МПК колистина резистентных мутантов *K.pneumoniae* значительно превышают концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась их селекция. В присутствии кларитромицина (2 мг/л), азитромицина (2 мг/л), рифампицина (1 мг/л), доксицилина (2 мг/л) происходит значительное (в 4–64 раза) снижение МПК<sub>М</sub> колистина. Меропенем в фиксированной фармакокинетической/фармакодинамической концентрации не оказывал значимого влияния на МПК<sub>М</sub> колистина карбапенемазопродуцирующих штаммов [4, 5, 12].

5. Биологическая стоимость резистентности у колистинорезистентных лабораторных мутантов *K.pneumoniae* проявляется увеличением продолжительности лаг-периода. Интенсивность размножения исходных штаммов и изогенных колистинорезистентных мутантов была сопоставимой, что позволяет сделать заключение об отсутствии влияния развившейся устойчивости на конкурентоспособность. Можно прогнозировать

дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину и ее сохранение в микробных популяциях *K.pneumoniae* даже в случае значительного сокращения потребления антибиотика [5, 10].

6. Эпидемиологически важным механизмом формирования устойчивости к полимиксидам является приобретение плазмидно-опосредованных фосфоэтаноламинтрансфераз *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*. Среди исследованных колистинорезистентных штаммов гены фосфоэтаноламинтрансфераз не обнаруживались, что свидетельствует о мутационной природе устойчивости к полимиксидам. Устойчивость к колистину у клинических изолятов *K.pneumoniae* была связана с инсерционной инактивацией гена *mgrB* транспозонами семейств IS1, IS4, IS5, а также функционально значимыми заменами в гене сенсорной киназы *pmrB*. Устойчивость к колистину у лабораторных колистинорезистентных мутантов *K.pneumoniae* связана делецией в гене *mgrB*, а также функционально значимой заменой T157P в гене сенсорной киназы *pmrB* [7, 13].

#### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Колистинорезистентные штаммы *K.pneumoniae*, депонированные в Республиканскую коллекцию патогенных биологических агентов Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», могут быть использованы в качестве референсных при выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований по определению чувствительности к полимиксидам и определению механизмов устойчивости.

2. Результаты определения чувствительности к комбинациям полимиксинов с другими антибиотиками для XDR штаммов *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, могут использоваться для проведения эмпирической комбинированной антибиотикотерапии до получения результатов микробиологического исследования. После выполнения клинических исследований комбинации колистина с карбапенемами и макролидами (кларитромицин, азитромицин) могут быть рекомендованы для медицинского использования с целью преодоления экстремальной и полной антибиотикорезистентности у *K.pneumoniae*.

3. Метод определения МПК колистина, изложенный в утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению, адаптирован для широкого внедрения в рутинную практику микробиологических лабораторий. Метод элюции колистина из дисков в бульон (CBDE) позволяет получать значения МПК, согласованные со значениями референсного метода, и может быть рекомендован для практического использования в микробиологических лабораториях [14].

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

### Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Распространенность карбапенемазопродуцирующих *Klebsiella pneumoniae* в Гомельской области / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская, Н. А. Бонда, А. И. Козлова, О. В. Осипкина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 4. – С. 53–58.

2. Тапальский, Д. В. Бактерицидная активность комбинаций антибиотиков в отношении экстремально - антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* с устойчивостью к колистину / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская // Медицинские новости. – 2020. – № 2. – С. 63–66.

3. Потенцирование антибактериальной активности колистина в отношении множественно- и экстремально-резистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* антибиотиками разных групп / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская, А. И. Козлова, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22, № 2. – С. 128–136.

4. Петровская, Т. А. Влияние антибиотиков разных групп на возникновение мутационной устойчивости к колистину у *Klebsiella pneumoniae* / Т. А. Петровская, Д. В. Тапальский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23, № 2 – С. 166–172.

5. Тапальский, Д. В. Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и ее биологическая стоимость / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская, А. Е. Козлов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98, № 4 – С. 426–433.

6. Сравнительная оценка методов определения минимальных подавляющих концентраций колистина / Т. А. Петровская, Д. В. Тапальский, И. С. Азизов, М. В. Эйдельштейн // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 335–345.

7. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к полимиксинам и антибиотикам других групп по данным полногеномного секвенирования / Т. А. Петровская, Е. В. Карпова, Д. В. Тапальский, Л. В. Можаровская, О. Ю. Баранов // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 34–41.

### Статьи в сборниках научных трудов и материалах конференций

8. Детекция генов карбапенемаз у экстремально антибиотикорезистентных грамотрицательных возбудителей бактериальных инфекций / Д. В. Тапальский, А. И. Козлова, Н. А. Бонда, Т. А. Петровская, Л. В. Лагун // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. респ. науч.-практ. конф. и 27-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 2–3 нояб. 2017 г. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.] – Гомель: ГомГМУ, 2018. – С. 748–751. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

9. Микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемазопродуцирующих колистинорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская // Вестник гематологии. – 2020. – Т. 16, № 3. – С. 57–58.

10. Биологическая стоимость устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных *Klebsiella pneumoniae* / Т. А. Петровская, Д. В. Тапальский // XXIV Кашкинские чтения : тез. Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, Российско-китайского конгресса по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии, Санкт-Петербург, 09–11 июня 2021 г. / Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 125.

11. Synergistic activity of combinations of colistin with other antibiotics against multidrug- and extensively drug resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / Т. А. Petrovskaya, D. V. Tapalski // Annual conference AMMI Canada SACMID 2021, Vancouver, April 25–30, 2021 / Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada (JAMMI). – 2021. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. 17.

12. Мутационная устойчивость к полимиксинам у экстремально-антибиотикорезистентных нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Т. А. Петровская, Е. В. Карпова, Д. В. Тапальский, О. Ю. Баранов // Актуальные вопросы микробиологии, иммунологии и инфектологии : сборник материалов межвузовской научно-практической конференции, Гродно, 29 октября 2021 года. – Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2021. – С. 85–87.

13. Мутационные механизмы устойчивости к колистину клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* / Т. А. Петровская, Д. В. Тапальский, Е. В. Карпова, О. Ю. Баранов // Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии: тез. респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, онлайн формат, Минск, 12 нояб. 2021 г. [Опубл. в сб.]

Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В. А. Горбунова. – Минск, 2021. – Вып. 14. – С. 237–238.

#### **Инструкции по применению**

14. Метод выявления устойчивости к полимиксидам у энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 21.05.2021 / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская, Е. В. Тимошкова, О. В. Осипкина. – Гомель: ГомГМУ, 2021. – 19 с.

**Пятроўская Таццяна Аляксандраўна**  
**Патэнцаванне антыбактэрыяльнай актыўнасці калісціну**  
**антыбіётыкамі розных груп**

**Ключавыя словы:** калісцін, камбінацыі антыбіётыкаў, сінэргічная актыўнасць, мутацыі, біялагічны кошт, рэзістэнтнасць.

**Мэта даследавання:** Выяўленне антыбіётыкаў, здольных патэнцыраваць бактэрыцыдную актыўнасць калісціну ў дачыненні да ўстойлівых да яго штамаў і эксперыментальнае абгрунтаванне метадаў камбінаванай антыбіётыкатэрапіі інфекцый, вызваных калістынарэзістэнтнымі мікраарганізмамі.

**Метады даследавання:** мікрабіялагічныя (вызначэнне адчувальнасці мікраарганізмаў да антыбіётыкаў і іх камбінацый, вызначэнне частаты ўзнікнення мутацыйнай ўстойлівасці да калісціну), малекулярна-генетычныя (дэтэкцыя генаў карбапенемаз і фосфаэтаналамінтрансфераз, геномнае секвеніраванне), статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:**

Метад элюцыі калісціну з дыскаў і метадаў мікраразвядзенняў у планшэтах Sensititre дазволілі атрымаць узнаўляльныя значэнні МПК для *K.pneumoniae*. Выяўлены эфект зніжэння МПК калісціну ў прысутнасці фармакакінетычнай / фармакадынамічнай канцэтрацыі кларытраміцыну, азітраміцыну і рыфампіцыну для штамаў *K.pneumoniae*, *A.baumannii* і *P.aeruginosa*. Паказана здольнасць да фарміравання *in vitro* калісцінарэзістэнтных субпапуляцый. Біялагічны кошт рэзістэнтнасці ў калісцінарэзістэнтных лабараторных мутантаў *K. pneumoniae* выяўляўся павелічэннем працягласці лаг-перыяду. У прысутнасці кларытраміцыну (2 мг / л), азітраміцыну (2 мг / л), рыфампіцыну (1 мг / л), даксіцыкліну (2 мг / л) адбывалася значнае (у 4–64 разы) зніжэнне мінімальнай канцэтрацыі калісціну, якія прадухіляюць селекцыю рэзістэнтных мутантаў. Устойлівасць да калісціну ў клінічных ізалятаў і лабараторных мутантаў *K.pneumoniae* звязана з інсэрцыйнай інактывацыяй гена *mgrB* і функцыянальна значнымі заменаў гена сэнсарнай кіназы *pmrB*.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** атрыманыя вынікі могуць выкарыстоўвацца для выяўлення ўстойлівасці да калісціну ў мікрабіялагічных лабараторыях і назначэння камбінаванай антыбіётыкатэрапіі.

**Галіна выкарыстання:** клінічная мікрабіялогія, антымیکробная хіміятэрапія, інфекцыйныя хваробы.

## РЕЗЮМЕ

### Петровская Татьяна Александровна Потенцирование антибактериальной активности колистина антибиотиками разных групп

**Ключевые слова:** колистин, комбинации антибиотиков, синергидная активность, мутации, биологическая стоимость, резистентность.

**Цель работы:** Выявление антибиотиков, способных потенцировать бактерицидную активность колистина в отношении устойчивых к нему штаммов и экспериментальное обоснование методов комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных колистинорезистентными микроорганизмами.

**Методы исследования:** микробиологические (определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и их комбинациям, определение частоты возникновения мутационной устойчивости к колистину), молекулярно-генетические (детекция генов карбапенемаз и фосфоэтаноламинтрансфераз, геномное секвенирование), статистические.

#### **Полученные результаты и их новизна:**

Метод элюции колистина из дисков и метод микроразведений в планшетах Sensititre позволили получить воспроизводимые значения МПК для *K.pneumoniae*. Выявлен эффект снижения МПК колистина в присутствии фармакокинетической/фармакодинамической концентрации кларитромицина, азитромицина и рифампицина для штаммов *K.pneumoniae*, *A.baumannii* и *P.aeruginosa*. Показана способность к формированию *in vitro* колистинорезистентных субпопуляций. Биологическая стоимость резистентности у колистинорезистентных лабораторных мутантов *K.pneumoniae* проявлялась увеличением продолжительности лаг-периода. В присутствии кларитромицина (2 мг/л), азитромицина (2 мг/л), рифампицина (1 мг/л), доксицилина (2 мг/л) происходило значительное (в 4–64 раза) снижение минимальных концентраций колистина, предотвращающих селекцию резистентных мутантов. Устойчивость к колистину у клинических изолятов и лабораторных мутантов *K.pneumoniae* связана с инсерционной инактивацией гена *mgrB* и функционально значимыми заменами в гене сенсорной киназы *pmrB*.

**Рекомендации по использованию:** полученные результаты могут использоваться для выявления устойчивости к колистину в микробиологических лабораториях и назначения комбинированной антибиотикотерапии.

**Область применения:** клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия, инфекционные болезни.

## ABSTRACT

**Petrovskaya Tatyana**  
**Potential of antibacterial activity of colistin**  
**by antibiotics of different groups**

**Keywords:** colistin, combinations of antibiotics, synergistic activity, mutations, biological cost, resistance.

**Aim of the study:** Identification of antibiotics capable of potentiating the bactericidal activity of colistin against strains resistant to it and experimental substantiation of methods for combined antibiotic therapy of infections caused by colistin-resistant microorganisms.

**Research methods:** microbiological (determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics and their combinations, determination of the frequency of occurrence of mutational resistance to colistin), molecular genetic (detection of carbapenemase and phosphoethanolamine transferase genes, genomic sequencing), statistical.

**Results and their novelty:**

The colistin disc elution method and the Sensititre plate microdilution method yielded reproducible MIC values for *K. pneumoniae*. The effect of reducing the MIC of colistin in the presence of pharmacokinetic/pharmacodynamic concentrations of clarithromycin, azithromycin and rifampicin for strains of *K.pneumoniae*, *A.baumannii* and *P.aeruginosa* was revealed. The ability to form colistin-resistant subpopulations *in vitro* has been shown. The biological cost of resistance in colistin-resistant laboratory mutants of *K.pneumoniae* was manifested by an increase in the duration of the lag period. In the presence of clarithromycin (2 mg/l), azithromycin (2 mg/l), rifampicin (1 mg/l), doxycycline (2 mg/l), there was a significant (4–64 times) decrease in the minimum concentrations of colistin, preventing the selection of resistant mutants. Colistin resistance in clinical isolates and laboratory mutants of *K.pneumoniae* is associated with insertional inactivation of the *mgrB* gene and functionally significant substitutions in the *pmrB* sensor kinase gene.

**Recommendations:** the results obtained can be used to detect resistance to colistin in microbiological laboratories and prescribe combination antibiotic therapy.

**Field of application:** clinical microbiology, antimicrobial chemotherapy, molecular biology, infectious diseases.





Научное издание

**ПЕТРОВСКАЯ Татьяна Александровна**

**ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
КОЛИСТИНА АНТИБИОТИКАМИ РАЗНЫХ ГРУПП**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**по специальности 03.02.03 – микробиология**

Подписано в печать 28.10.2022.

Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная 80 г/м<sup>2</sup>. Гарнитура «Times New Roman».  
Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,53. Тираж 66 экз. Заказ № 468.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.  
ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.