

Бактерицидная активность комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* с устойчивостью к колистину

Тапальский Д.В., Петровская Т.А.

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

Tapalski D.V., Petrovskaya T.A.
Gomel State Medical University, Belarus

Bactericidal activity of antibiotic combinations against extensively drug resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* with resistance to colistin

Резюме. Для 43 экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к колистину, определена бактерицидная активность фармакокинетических / фармакодинамических концентраций колистина, карбапенемов, кларитромицина, рифампицина и их комбинаций. Выявлена синергидная активность комбинаций колистина с кларитромицином, которая усиливалась в присутствии меропенема или дорипенема. Бактерицидный эффект комбинаций из двух карбапенемов (меропенем + эртапенем, дорипенем + эртапенем) проявлялся только в отношении штаммов с относительно невысокими значениями МПК меропенема (4–32 мкг/мл).

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, колистин, кларитромицин, карбапенемы.

Медицинские новости. – 2020. – №2. – С. 63–66.

Summary. The bactericidal activity of pharmacokinetic / pharmacodynamic concentrations of colistin, carbapenems, clarithromycin, rifampicin and their combinations was determined for 43 extensively drug resistant *K. pneumoniae* strains resistant to colistin. A synergistic activity of colistin combinations with clarithromycin was revealed, which intensified in the presence of meropenem or doripenem. The bactericidal effect of double-carbapenem combinations (meropenem/ertapenem, doripenem/ertapenem) was manifested only against strains with relatively low values of the meropenem MIC (4–32 µg/ml).

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, carbapenemases, colistin, clarithromycin, carbapenems.

Meditsinskie novosti. – 2020. – №2. – P. 63–66.

Устойчивые к карбапенемам энтеробактерии, наряду с *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, представляют серьезную угрозу для глобального здравоохранения и отнесены экспертами Всемирной организации здравоохранения к группе наиболее приоритетных бактериальных возбудителей для проведения исследований и создания новых антибиотиков [10]. Основным механизмом устойчивости энтеробактерий к карбапенемам является продукция карбапенемаз КРС, NDM, OXA-48 [4, 11]. Карбапенемазопродуцирующие штаммы *Klebsiella pneumoniae* широко распространены в организациях здравоохранения Беларуси и имеют ассоциированную устойчивость к большинству не-беталактаменных антибиотиков [3]. Вынужденное широкое использование колистина в качестве препарата последнего резерва для лечения инфекций, вызванных карбапенеморезистентными штаммами, привело к появлению панрезистентных штаммов, нечувствительных ко всем антибиотикам из всех классов [6]. По данным российского многоцентрового исследования

«МАРАФОН», в 2015–2016 гг. устойчивыми к колистину были 18,6% нозокомиальных штаммов энтеробактерий, в том числе 21,2% штаммов, продуцирующих карбапенемазы [1].

Комбинированная антибиотикотерапия в настоящее время является единственной возможностью для лечения инфекций, вызванных панрезистентными микроорганизмами [12]. Надежно прогнозировать микробиологическую и клиническую эффективность комбинаций антибиотиков не представляется возможным, поскольку панрезистентные микроорганизмы несут в себе уникальные сочетания различных генетических детерминант и механизмов антибиотикорезистентности, что требует проведения лабораторных исследований по определению чувствительности к комбинациям антибиотиков для штаммов, выделенных от конкретных пациентов.

Цель исследования – выявление комбинаций антибиотиков с бактерицидной активностью в отношении колистинорезистентных карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделен-

ных в организациях здравоохранения Беларуси.

Материалы и методы

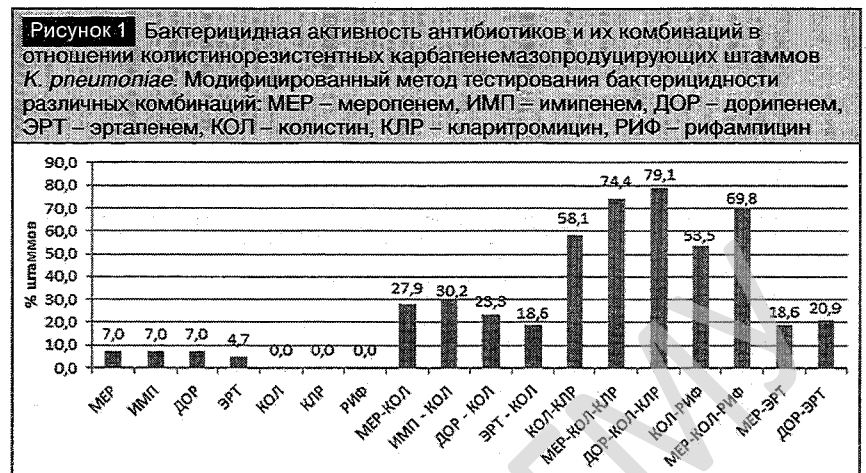
В исследование включено 43 штамма *K. pneumoniae*, выделенных в 2015–2018 гг. от госпитализированных пациентов в организациях здравоохранения Минска (24 штамма из 8 организаций здравоохранения), Гомеля (11 штаммов из 3 организаций здравоохранения), Витебска (1 штамм) и районных центров Гомельской области (7 штаммов из 6 центральных районных больниц). Указанные штаммы были выделены из крови (22 штамма – 51,2%), мокроты (4 штамма – 9,3%), мочи (8 штаммов – 18,6%), раневого отделяемого (9 штаммов – 20,9%) пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии (74,4%), а также в отделения хирургического и терапевтического профиля.

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков выполняли методом последовательных микроразведений в бульоне Мюллер – Хинтон (BD, США) в соответствии с ISO 20776-1:2006. Все штаммы были

нечувствительны к карбапенемам (МПК меропенема >2 мкг/мл) и колистину (МПК колистина >2 мкг/мл) и имели фенотипы экстремальной (XDR) или полной (PDR) антибиотикорезистентности. Наличие генов карбапенемаз определено методом ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL» (Российская Федерация). Устойчивость к карбапенемам у всех включенных в исследование штаммов была обусловлена продукцией карбапенемаз (OXA-48 – 34 штамма, NDM – 5 штаммов, KPC – 2 штамма, сочетание NDM и OXA-48 – 2 штамма).

Определение бактерицидной активности отдельных антибиотиков и их комбинаций выполнено с использованием модифицированного метода тестирования бактерицидности различных комбинаций (Multiple combination bactericidal testing, MCBT) [2, 5]. Тестировались пограничные фармакокинетические / фармакодинамические (ФК/ФД) концентрации антибиотиков, приведенные в EUCAST [7] и других источниках. Определяли бактерицидную активность меропенема (8 мкг/мл), имипенема (8 мкг/мл), дорипенема (2 мкг/мл), эртапенема (1 мкг/мл), колистина (2 мкг/мл), кларитромицина (1 мкг/мл), рифампицина (2 мкг/мл), а также 11 их комбинаций (меропенем + колистин, имипенем + колистин, дорипенем + колистин, эртапенем + колистин, колистин + кларитромицин, меропенем + колистин + кларитромицин, дорипенем + колистин + кларитромицин, колистин + рифампицин, меропенем + колистин + рифампицин, меропенем + эртапенем, дорипенем + эртапенем).

На втором этапе исследования для оценки способности антибиотиков потенцировать активность колистина в отношении колистинорезистентных штаммов *K. pneumoniae* выполнялось определение МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации второго антибиотика, соответствующей его ФК/ФД концентрации. При отсутствии сведений о ФК/ФД концентрации антибиотика тестировали концентрацию, соответствующую пограничному значению МПК для стафилококков (рифампицин, макролиды), рекомендованную EUCAST [7]. Фактор потенцирования (ФП) рассчитывали как соотношение МПК колистина к МПК



колистина в присутствии фиксированной концентрации второго антибиотика.

Контроль качества исследований выполняли с использованием референтных штаммов Американской коллекции типовых культур *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 29213.

Результаты и обсуждение

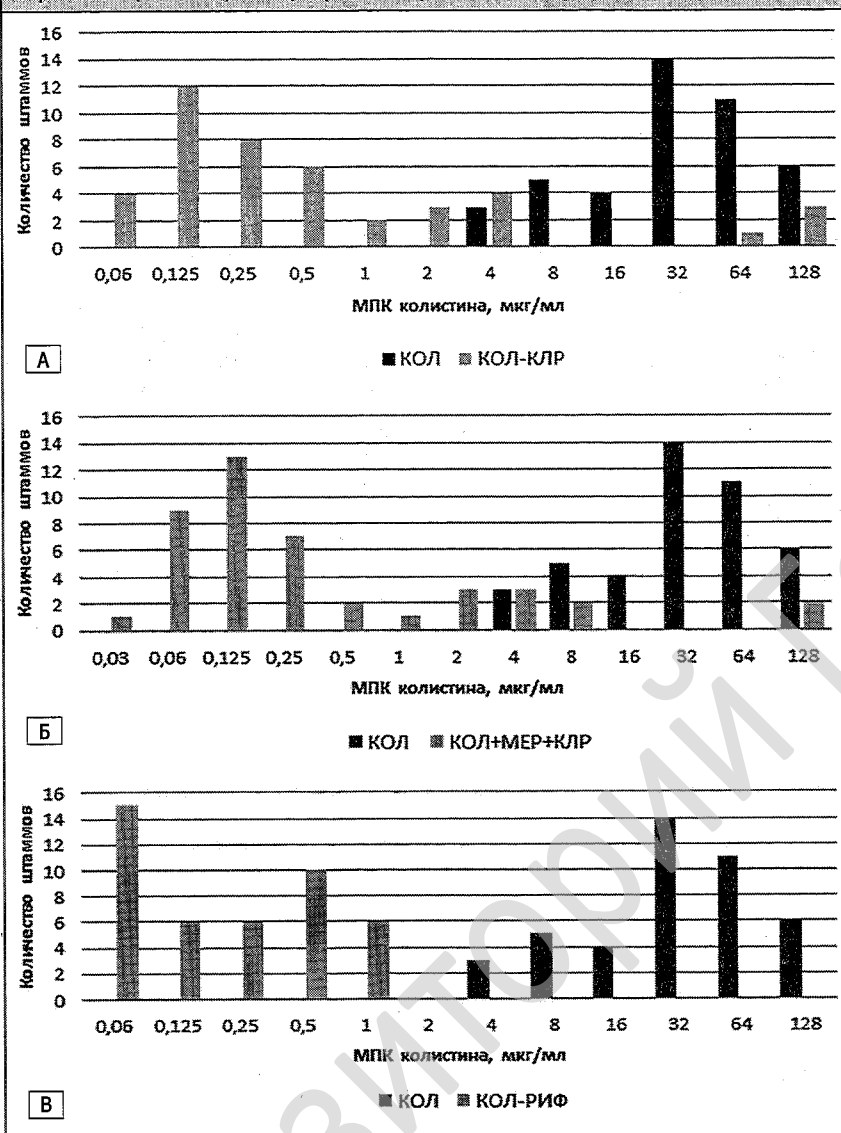
Результаты определения бактерицидной активности антибиотиков и их комбинаций, полученные с использованием модифицированного MCBT, представлены на рисунке 1. Бактерицидная активность колистина, кларитромицина и рифампицина отсутствовала. Бактерицидный эффект карбапенемов отмечен в отношении единичных штаммов (4,7–7,0%), все они являлись продуцентами карбапенемазы OXA-48 и имели невысокие МПК меропенема (4–8 мкг/мл). Бактерицидный эффект двойных комбинаций на основе колистина и карбапенемов проявлялся в отношении только 18,6–30,2% штаммов, что может быть связано с высокими значениями МПК колистина, значительно превышающими тестируемую в составе комбинаций концентрацию 2 мкг/мл.

Бактерицидный эффект комбинаций из двух карбапенемов (меропенем + эртапенем и дорипенем + эртапенем) отмечен только для 18,6–20,9% штаммов. Дополнительный анализ эффективности этих комбинаций позволил выявить связь с МПК карбапенемов и присутствием карбапенемаз различных типов. Все чувствительные к комбинациям меропенем + эртапенем и дорипенем + эртапенем штаммы *K. pneumoniae* являлись продуцентами карбапенемазы OXA-48 и имели МПК меропенема не более 32 мкг/мл. В то же время для

продуцентов карбапенемазы KPC (МПК меропенема – 64 и 1024 мкг/мл), NDM (МПК меропенема – 128–1024 мкг/мл), ко-продуцентов карбапенемаз NDM и OXA-48 (МПК меропенема – 512 мкг/мл) бактерицидный эффект комбинаций из двух карбапенемов отсутствовал. Таким образом, МПК меропенема может быть предиктором эффективности указанных двойных комбинаций. Подобные результаты приведены в статье A. Oliva и соавт., где с использованием метода шахматной доски и кривых роста-отмирания показана зависимость синергидной активности комбинации меропенем + эртапенем в отношении карбапенемазопroduцирующих штаммов *K. pneumoniae* от величины МПК меропенема [8]. Для прогнозирования клинической эффективности комбинаций из двух карбапенемов требуется определение истинных значений МПК меропенема или дорипенема, поскольку получаемые с помощью широко используемых автоматизированных микробиологических анализаторов результаты (МПК ≥ 16 мкг/мл) могут соответствовать различным значениям МПК и не позволяют оценивать активность имеющихся у штамма карбапенемаз или иных механизмов устойчивости к карбапенемам.

Наиболее активными из двойных комбинаций являлись комбинации колистин + кларитромицин и колистин + рифампицин (бактерицидный эффект в отношении соответственно 58,1% и 53,5% исследуемых штаммов). Добавление в указанные комбинации карбапенемов усиливало синергидный эффект, наибольшая активность отмечена для комбинации дорипенем + колистин + кларитромицин (79,1% чувствительных штаммов).

Рисунок 2 Распределение МПК колистина и МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации антибиотика: А – кларитромицин (1 мкг/мл); Б – меропенем (8 мкг/мл) и кларитромицин (1 мкг/мл); В – рифампицин (2 мкг/мл)



Выявленный синергидный эффект колистина с антибиотиками, не способными в обычных условиях проникать через наружную мембрану *K. pneumoniae* и других грамотрицательных бактерий к внутриклеточным мишеням, заслуживает более детального изучения в отношении колистинорезистентных штаммов с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью. На рисунке 2 представлены гистограммы распределения МПК колистина и МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации кларитромицина (1 мкг/мл), рифампицина (2 мкг/мл), а также фиксированных концентраций кларитромицина (1 мкг/мл) и меропенема (8 мкг/мл). Эффект снижения МПК колистина (в 2 раза и

более) в присутствии 1 мкг/мл кларитромицина отмечен для 93,0% штаммов *K. pneumoniae*, при этом для 81,4% штаммов выявлено снижение МПК колистина до или ниже порогового значения 2 мкг/мл, что формально восстанавливало их чувствительность. В присутствии 1 мкг/мл кларитромицина и 8 мкг/мл меропенема эффект потенцирования усиливался и отмечался уже в отношении 95,3% штаммов, для 84,0% штаммов МПК колистина уменьшалась до или ниже порогового значения 2 мкг/мл. Антагонистический эффект (увеличение МПК колистина в присутствии фиксированных концентраций кларитромицина или кларитромицина и меропенема) не был отмечен ни для одного из включенных

в исследование штаммов. Эффект снижения МПК колистина в присутствии 2 мкг/мл рифампицина отмечен для всех включенных в исследование штаммов *K. pneumoniae*, при этом МПК колистина снижалась до 0,06–1 мкг/мл.

Средние значения \log_2 ФП (отражают количество двукратных разведений, на которое уменьшилась МПК колистина при добавлении фиксированной концентрации второго антибиотика) составили $5,72 \pm 0,44$ при внесении 1 мкг/мл кларитромицина, $6,44 \pm 0,39$ – при внесении 1 мкг/мл кларитромицина и 8 мкг/мл меропенема, $7,21 \pm 0,40$ – при внесении 2 мкг/мл рифампицина.

Выявлено 2 штамма *K. pneumoniae* с высокими уровнями устойчивости к колистину (МПК – 128 мкг/мл), для которых не отмечался синергидный эффект колистина в присутствии фиксированных концентраций кларитромицина и кларитромицина с меропенемом. Вместе с тем в присутствии 2 мкг рифампицина МПК колистина для этих штаммов снижалась в 128 и 512 раз до 0,25–1,0 мкг/мл, что указывает на вероятный механизм выявленных синергидных взаимодействий. В многочисленных исследованиях было показано, что колистин повышает эффективность ряда антибиотиков, обеспечивая их проникновение в клетку, но при этом не влияет на их внутриклеточную активность [9]. Вероятно, в отношении колистинорезистентных штаммов *K. pneumoniae* эффект потенцирования за счет увеличения проницаемости наружной мембраны проявляется даже при воздействии небольших концентраций колистина, не способных самостоятельно вызвать лизис микробной клетки.

Заключение

Выявлена выраженная синергидная активность комбинаций колистина с кларитромицином в отношении колистинорезистентных карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, которая усиливалась в присутствии меропенема или дорипенема. Наибольшая микробиологическая активность обнаружена для комбинации дорипенем (2 мкг/мл) – колистин (2 мкг/мл) – кларитромицин (1 мкг/мл), которая оказывала бактерицидное действие на 79,1% штаммов. Возможным механизмом выявленных синергидных взаимодействий является значительное увеличение проницаемости наружной

мембраны для макролидов в присутствии даже небольших концентраций колистина, что делает возможным их доступ к внутриклеточным мишеням.

Бактерицидный эффект комбинаций из двух карбапенемов (меропенем + эртапенем, дорипенем + эртапенем) проявлялся только в отношении штаммов с относительно невысокими значениями МПК меропенема (4–32 мкг/мл), что требует определения истинных МПК карбапенемов для прогнозирования клинической эффективности указанных комбинаций при лечении инфекций, вызванных экстремально антибиотикорезистентными штаммами *K. pneumoniae*.

Полученные результаты открывают перспективы для клинического использования альтернативных схем комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных колистинорезистентными XDR и PDR штаммами *K. pneumoniae*,

основанных на включении антибиотиков, не способных в обычных условиях проникать через наружную мембрану. Доступ антибиотиков к внутриклеточным мишеням открывается в присутствии концентраций колистина, часто не превышающих его ФК/ФД концентрации, а эффект комбинированного воздействия является бактерицидным и проявляется даже в отношении колистинорезистентных штаммов с высокими значениями МПК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т.21, №2. – С.147–159.
2. Тапальский Д.В. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т.20, №3. – С.182–191.
3. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О. и др. // Здоровоохранение. – 2017. – №3. – С.40–47.
4. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. //

- Медицинский журнал. – 2012. – №2. – С.10–15.
5. Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A., et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – Vol.161. – P.1206–1212.
 6. Bradford P.A., Kazmierczak K.M., Biedenbach D.J., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol.60. – P.1385–1392.
 7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 9.0., 2019. Available at: www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Accessed October 01, 2019.
 8. Oliva A., Scorzolini L., Cipolla A., et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2017. – Vol.72. – P.1981–1984.
 9. Sheu C.C., Chang Y.T., Lin S.Y., et al. // Front. Microbiol. – 2019. – Vol.10. – Art.80.
 10. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., et al. // Lancet Infect. Dis. – 2018. – Vol.18. – P.318–327.
 11. van Duin D., Doi Y. // Virulence. – 2017. – Vol.8. – P.460–469.
 12. Zavascki A.P., Bulitta J.B., Landersdorfer C.B. // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2013. – Vol.11. – P.1333–1353.

Поступила 22.11.2019 г.