

Тапальский Д.В., Петровская Т.А.

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

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель

Tapalski D.V., Petrovskaya T.A.

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

Gomel State Medical University, Gomel

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

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

Устойчивые к карбапенемам энтеробактерии, наряду *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, представляют серьезную угрозу для глобального здравоохранения и отнесены экспертами ВОЗ к группе наиболее приоритетных бактериальных возбудителей для проведения исследований и создания новых антибиотиков [10]. Основным механизмом устойчивости энтеробактерий к карбапенемам является продукция карбапенемаз KPC, NDM, OXA-48 [4, 11]. Карбапенемазопродуцирующие штаммы *Klebsiella pneumoniae* широко распространены в организациях здравоохранения Беларуси и имеют ассоциированную устойчивость к большинству не-беталактамных 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*, выделенных 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» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 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, МСВТ) [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 МСВТ, 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.

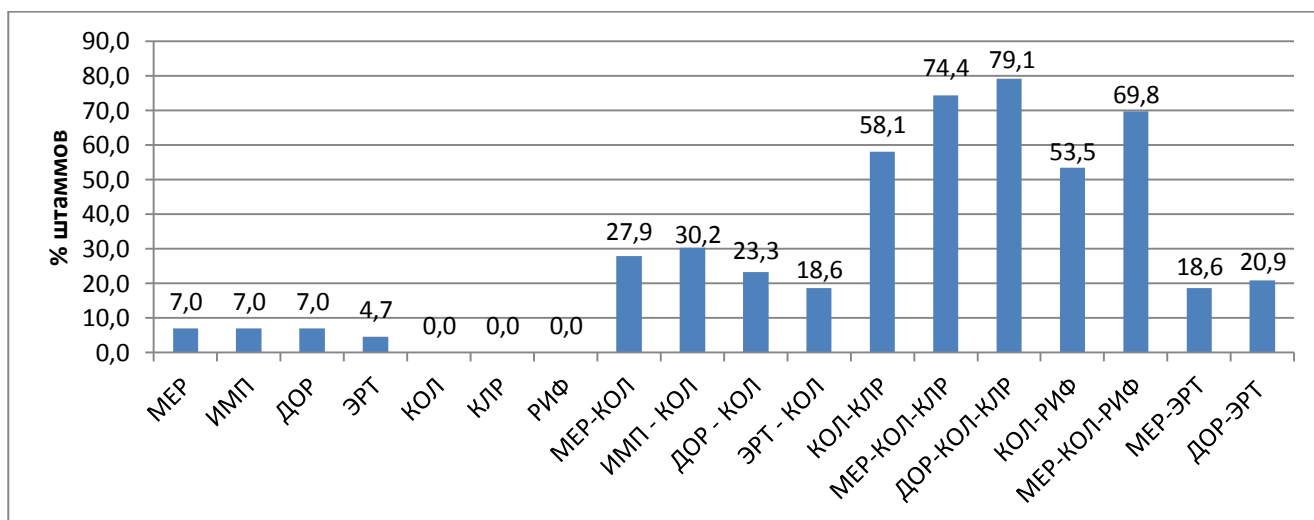


Рисунок 1. Бактерицидная активность антибиотиков и их комбинаций в отношении колистинорезистентных карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae*. Модифицированный метод тестирования бактерицидности различных комбинаций МЕР – меропенем, ИМП – имипенем, ДОР – дорипенем, ЭРТ – эртапенем, КОЛ – колистин, КЛР – кларитромицин, РИФ - рифампицин

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 Oliva A. и соавт., где с использованием метода «шахматной доски» и кривых роста-отмирания показана зависимость синергидной активности комбинации меропенем-эртапенем в отношении карбапенемаза-продуцирующих 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 \geq 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).

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 и более раз) в присутствии 1 мкг/мл кларитромицина отмечен для 93,0% штаммов *K.pneumoniae*, при этом для

81,4% штаммов отмечено 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.

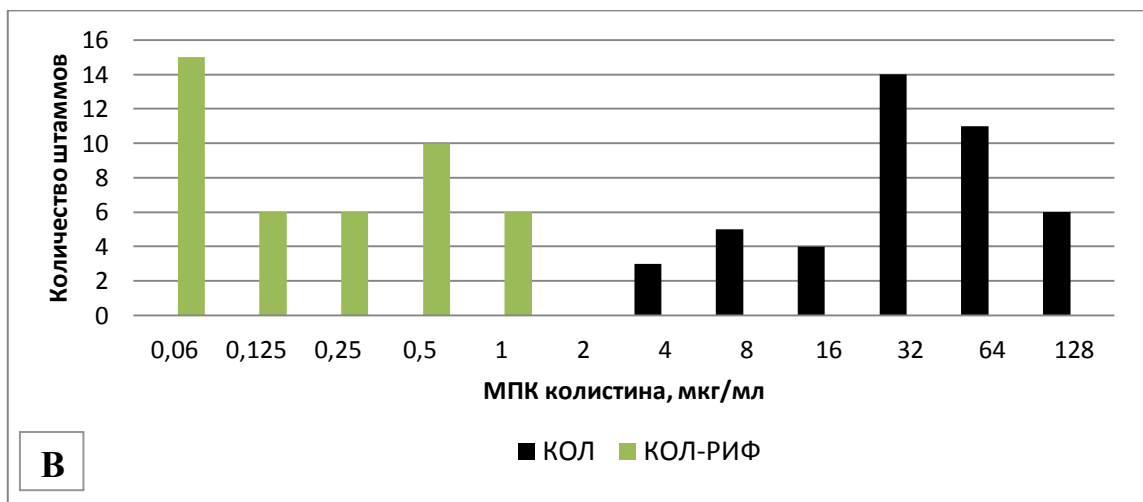
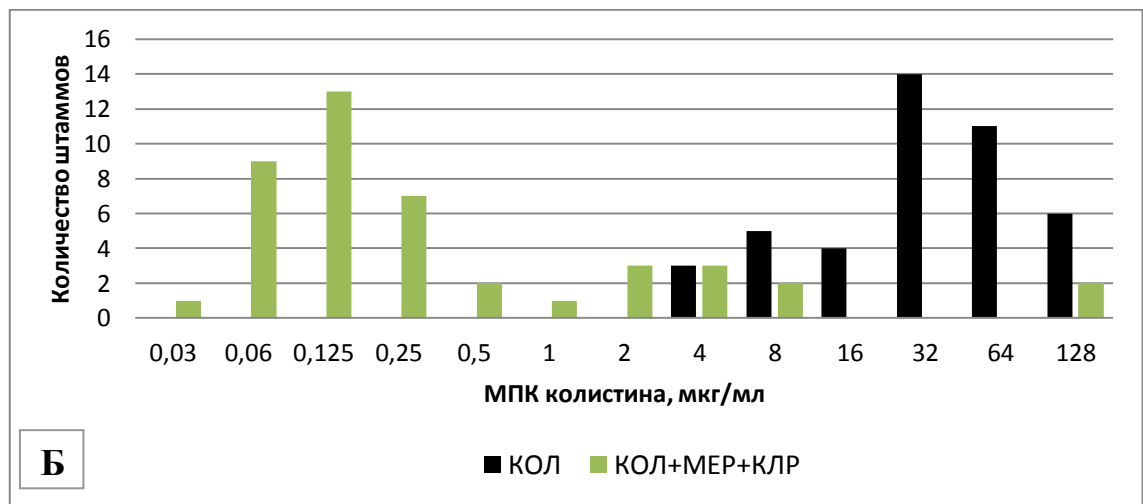
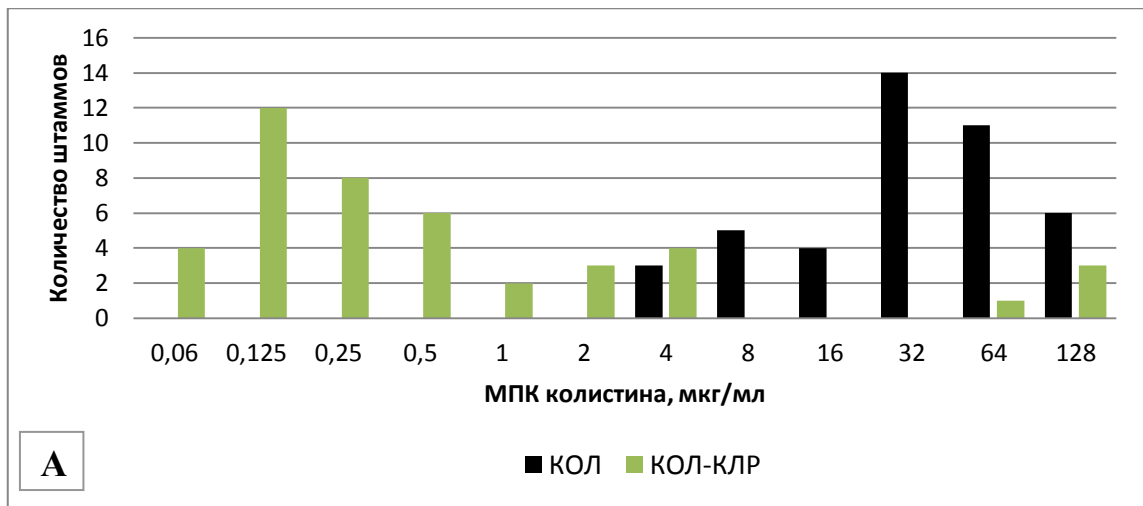


Рисунок 2. А - распределение МПК колистина, МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации кларитромицина (1 мкг/мл); Б - распределение МПК колистина, МПК колистина в присутствии фиксированных концентраций меропенема (8 мкг/мл) и кларитромицина (1 мкг/мл); В - распределение МПК колистина, МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации рифампицина (2 мкг/мл).

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., Склеенова 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.

Сведения об авторах

Тапальский Дмитрий Викторович, д.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета



Петровская Татьяна Александровна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета

Адрес для переписки

ул. Ланге, 5, Гомель, 246050, Беларусь

Тел. +37529 7354293

Факс +375232 35-98-38

E-mail: tapalskiy@gsmu.by