

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

А.Г. Афиногенова^{1,2}, Т.М. Ворошилова³, Г.Е. Афиногенов², Д.Ю. Мадай²

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Устойчивость к антибиотикам среди микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* обусловлена комбинацией нескольких механизмов, например, гиперпродукцией бета-лактамаз, снижением проницаемости внешней мембраны микробной клетки (обычно это связано с утратой пориновых белков), наличием системы эффлюкса. Особого внимания заслуживают металло-бета-лактамазы (МБЛ), наличие которых обуславливает устойчивость грамотрицательных микроорганизмов ко всем бета-лактамам антибиотикам (в некоторых случаях, кроме азтреонама). В настоящее время нет ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных для применения в клинике. Поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, послужил основанием для выполнения данного исследования. Работу проводили в 3 этапа: 1) создание модельной системы с использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки повышения минимальных подавляющих концентраций (МПК) карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним штаммов грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*; 2) оценка эффективности перспективных ингибиторов МБЛ в присутствии того же стандартного реактива фермента; 3) оценка способности выявленных ингибиторов усиливать действие карбапенемов в отношении клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ, по показателям МПК и индекса фракционной ингибирующей концентрации (ФИК). Стандартный метод «шахматной доски» модифицировали для оценки сочетанного применения антибиотика из группы карбапенемов и потенциального ингибитора МБЛ — лекарственного препарата из группы бисфосфонатов — этидроновой кислоты. С использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, создали модельную систему, которая позволяет оценить перспективность новых ингибиторов МБЛ грамотрицательных микроорганизмов. Выявлен дозозависимый эффект повышения уровня МПК меропенема от количества реактива МБЛ в модельной системе в отношении ранее чувствительных к антибиотику референс-штаммов микроорганизмов. Отмечена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, в исследованиях показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ, наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности (2 мкг/мл). Выявлено синергидное действие (индекс ФИК < 0,5) соче-

Адрес для переписки:

Афиногенова Анна Геннадьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 557-88-94 (моб.). Факс: 8 (812) 232-92-17.
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Contacts:

Anna G. Afinogenova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 557-88-94 (mobile). Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: spbtestcenter@mail.ru

Библиографическое описание:

Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Мадай Д.Ю.
Оценка эффективности нового ингибитора металло-бета-лактамазы
в условиях модельной системы *in vitro* // Инфекция и иммунитет. 2016.
Т. 6, № 4. С. 335–344. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-335-344

Citation:

Afinogenova A.G., Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Maday D.Yu. The new
metall-beta-lactamase's inhibitor efficacy in a model system *in vitro* //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016,
vol. 6, no. 4, pp. 335–344. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-335-344

танного применения меропенема с этидроновой кислотой в отношении клинических резистентных к карбапенемам изолятов грамотрицательных микроорганизмов, при этом показано усиление действия антибиотика в 8–512 раз по сравнению с исходным уровнем МПК.

Ключевые слова: металло-бета-лактамаза (МБЛ), карбапенемрезистентные грамотрицательные микроорганизмы, ингибиторы МБЛ, бисфосфонаты, этидроновая кислота, метод «шахматной доски».

THE NEW METALL-BETA-LACTAMASE'S INHIBITOR EFFICACY IN A MODEL SYSTEM *IN VITRO*

Afinogenova A.G.^{a,b}, Voroshilova T.M.^c, Afinogenov G.E.^b, Maday D.Yu.^b

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c The Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The *Enterobacteriaceae* antibiotics resistance depends on a combination of several mechanisms, such as the beta-lactamases overproduction, the microbial cell reduction outer membrane permeability (usually associated with loss of protein porin), the presence of efflux systems. Particularly noteworthy are the metallo-beta-lactamases (MBL) whose presence causes resistance of gram-negative microorganisms to all beta-lactam antibiotics (in some cases except aztreonam). Currently there are no MBL inhibitors permitted for use in the clinic. The effective inhibitors search for carbapenem-resistant bacteria' MBL authorized for use in the clinic and reinforcing effects of carbapenems, served as the basis for the present study. The work was carried out in three stages: 1) creating a model system using a standard enzyme reagent metallo-beta-lactamase *P. aeruginosa* recombinant expressed in *E. coli*, to evaluate the increasing of minimal inhibitory concentrations (MIC) of carbapenems against previously sensitive Gram-negative microorganisms strains *in vitro*; 2) evaluation of MBL promising inhibitors in the presence of the same standard enzyme reagent; 3) evaluation of the ability of the identified inhibitors increase the carbapenems effects against clinical isolates of Gram-negative microorganisms producing MBL, in terms of the their MIC and fractional inhibitory concentration index (FIC index). The checkerboard array was modified to evaluate the combined use of carbapenems and potential MBL inhibitor — a drug from the group of bisphosphonates — etidronic acid. Using a standard enzyme reagent metallo-beta-lactamase *P. aeruginosa* recombinant expressed in *E. coli*, we created a model system that allows to assess the prospects of new inhibitors MBL gram-negative microorganisms. A dose-dependent effect of increasing the meropenem level MIC from reagent MBL quantity in a model system against previously antibiotic sensitive reference strains of microorganisms was revealed. MBL enzyme inactivation was noted in the presence of even small doses of bisphosphonate, in the tests the appearance of logarithmic phase of *P. aeruginosa* ATCC 27853 growth was shown delayed up to 12 hours compared to the control. In this case the maximum dose of etidronic acid 50 000–100 000 µg/ml completely inhibited the MBL, there was no a log phase microbe's growth due to the effect of meropenem on the reference level of sensitivity (2 µg/ml). The synergistic effect (FIC index < 0.5) of combined meropenem with etidronic acid use was identified against clinical isolates Gram-negative microorganisms resistant to carbapenems and producing MBL, wherein the enhancing action of the antibiotic was more 8–512 times compared with the initial MIC levels.

Key words: metall-β-lactamase (MBL), carbapenem-resistant Gram-negative bacteria, inhibitors of MBL, bisphosphonates, etidronic acid, checkerboard array.

Введение

Одной из причин развития внутрибольничных инфекций является рост числа антибиотикорезистентных возбудителей инфекции на фоне нерационального применения антибиотиков [2, 4, 5, 27]. Устойчивость к ним среди микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* обусловлена комбинацией нескольких механизмов, например, гиперпродукцией бета-лактамаз, снижением проницаемости внешней мембраны микробной клетки (обычно это связано с утратой пориновых белков), наличием системы эффлюкса [13, 14, 34, 35, 38].

В результате мониторинга микробиоты отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), отделений хирургического профиля в последние годы среди выявленных изоля-

тов грамотрицательных микроорганизмов наблюдают нарастание количества резистентных к карбапенемам (с 20 до 90%) [6, 7, 16, 17, 18, 20, 24]. Особого внимания заслуживают металло-бета-лактамазы (МБЛ), наличие которых обуславливает устойчивость грамотрицательных микроорганизмов ко всем бета-лактамам антибиотикам (в некоторых случаях, кроме азтреонама) [11, 19, 25].

В связи с возросшей частотой выделения изолятов грамотрицательных микроорганизмов, резистентных к карбапенемам, актуальным остается поиск способов усиления действия антибиотиков этого класса [10, 12, 15, 30]. Одним из возможных способов усиления действия карбапенемов является их комбинация с препаратами — эффективными ингибиторами МБЛ [1, 8, 23]. К сожалению, в настоящее время ин-

гибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных для применения в клинике, нет. Лечение таких нозокомиальных инфекций традиционными схемами неэффективно; для терапии, как правило, подбирают комбинации антибиотиков из 2–3, а иногда и 4-х препаратов [22, 26, 29, 33, 36, 37].

Поиск эффективных ингибиторов МБЛ карбапенемрезистентных микроорганизмов, разрешенных к применению в клинике и усиливающих действие карбапенемов, послужил основанием для выполнения данного исследования. Работу проводили в 3 этапа: 1) создание модельной системы с использованием стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки повышения МПК карбапенемов в отношении ранее чувствительных к ним штаммов грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*; 2) оценка эффективности перспективных ингибиторов МБЛ в присутствии того же стандартного реактива фермента; 3) оценка способности выявленных ингибиторов усиливать действие карбапенемов в отношении клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ.

Материалы и методы

Для оценки повышения уровня МПК меропенема использовали чувствительные к нему (МПК 2 мкг/мл) референс-штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC ВАА-747. Для получения инокуляма тест-штаммов готовили исходную суспензию суточной культуры соответствующего микроба по стандарту 0,5 McFarland, далее суспензию разводили в 31 раз в бульоне Мюллера–Хинтон, при этом полученная взвесь содержала 5×10^6 КОЕ/мл. Конечная нагрузка референс-штаммов составила 5×10^4 КОЕ в 200 мкл, экспозиция 24 ч.

Для определения активности фермента в отношении меропенема (в дозах 2–512 мкг/мл) использовали микрометод перекрестного титрования («шахматной доски»), который был предложен для тестирования чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию двух антибиотиков [11, 28]. В наших исследованиях данный метод модифицирован для моделирования приобретения устойчивости микроорганизмами, а также для оценки эффективности сочетанного действия карбапенема и потенциального ингибитора МБЛ. Каждая ячейка обозначена на пересечении номера ряда и соответствующей буквы. Стандартную упаковку реактива фермента МБЛ, содержащую 1469 единиц активности, разводили в 13,12 мл стерильной дистиллированной воды, получая содержание 112 единиц активности МБЛ в 1 мл раствора.

В качестве потенциального ингибитора МБЛ изучали лекарственное средство из группы бисфосфонатов: отечественный препарат «Ксидифон» (этидроновая кислота, или (1-гидроксиэтилиден)бис[фосфоновая] кислота) производства ООО «Мосхимфармпрепараты», который из исходного 20% концентрата титровали методом серийных разведений. Подавление фермента МБЛ бисфосфонатом и, как следствие, отсутствие роста тест-штаммов подтверждали в микроячейках, а также на ридере ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc., США). Измерение проводили при двух длинах волн (490 и 630 нм) при экспозициях от 4 до 24 часов; при бихроматическом измерении значение оптической плотности является разницей двух измерений, при этом значительно снижается погрешность результатов, вызванная царапинами или отпечатками пальцев на планшете.

Для оценки способности выявленного ингибитора усиливать действие меропенема в отношении грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МБЛ, использовали клинические резистентные изоляты *P. aeruginosa* 532/14 (МПК меропенема 512 мкг/мл), у которого фенотипически (методом Е-теста) и генотипически (методом ПЦР) подтвердили наличие МБЛ генотипа VIM, а также *A. baumannii* 346/14 (МПК меропенема 128 мкг/мл), при генотипировании которого МБЛ не обнаружена, но подтверждено ее наличие фенотипически с помощью Е-теста с ЭДТА [3]. МПК этидроновой кислоты составила 200 мг/мл. В опытах оставляли ячейку К1 — контроль роста тест-штамма и ячейку К2 — контроль среды и отсутствие роста. Разведение в ячейке, содержимое которой было прозрачным, считали МПК препаратов после высева на плотную питательную среду и получения роста тест-штамма.

Все опыты проводили в 96-луночных микропланшетах одновременно в трех повторностях, результаты подвергали статистической обработке по Фишеру–Стьюденту с вычислением доверительного интервала.

Результаты

Для определения активности стандартного реактива фермента МБЛ в отношении карбапенемов в присутствии чувствительных референс-штаммов использовали титрование микрометодом из начальной дозы 0,112 ед. акт. в 1 мкл. В опыты брали объем реактива МБЛ 5 мкл с дозой 0,56 ед. акт., из которой в среде Мюллера–Хинтон раститровывали фермент до дозы 0,0022 ед. акт. Для модификации метода «шахматной доски» в ячейки, содержащие по 92,5 мкл разведения меропенема, вносили по 92,5 мкл среды Мюллера–Хинтон, добавляли по 5 мкл разведения реактива МБЛ и по 10 мкл микробной взвеси.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИНАКТИВАЦИИ МЕРОПЕНЕМА В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ ДОЗ СТАНДАРТНОГО РЕАКТИВА МБЛ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *P. AERUGINOSA* ATCC 27853

№ ряда	Количество фермента МБЛ, ед. акт. в ячейке	Количество меропенема, мкг/мл									
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
		Наличие роста тест-культуры (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05)									
1	0,28	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	0,14	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	0,07	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	0,035	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	0,0175	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
6	0,0088	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
7	0,0044	–	–	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р
8	0,0022	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Р
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853; «–» — отсутствие роста.

В таблице 1 представлены результаты инактивации меропенема в присутствии реактива МБЛ в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853. Фермент в рядах 1–3 полностью инактивировал антибиотик, при этом наблюдали рост тест-штамма. Начиная с 4-го ряда, интенсивность инактивации ферментом снижалась, и в 8-м ряду отмечали отсутствие роста тест-культуры до уровня референтного значения чувствительности по EUCAST-2016 — 2 мкг/мл.

В таблице 2 представлены результаты инактивации меропенема в присутствии реактива МБЛ в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747. Показано, что фермент в рядах 1–4 полностью инактивировал антибиотик в количестве от 1 до 512 мкг/мл, при этом в ячейках наблюдали рост тест-штамма. Начиная с 5-го ряда, интенсивность инактивации фермента снижалась, и в 8-м ряду отмечали отсутствие роста тест-культуры до уровня референтного значения чувствительности — 2 мкг/мл.

Результаты исследования показали дозозависимый эффект повышения уровня МПК меропенема в отношении ранее чувствительных к нему штаммов грамотрицательных микроорганизмов в зависимости от количества стандартного реактива МБЛ в модельной системе. При этом в каждом опыте наблюдали разное количество реактива МБЛ, которое приводило к максимальным значениям уровня МПК меропенема: в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853 — 0,07 ед. акт., *A. baumannii* ATCC ВАА-747 — 0,035 ед. акт. Можно предположить, что это связано со скоростью генерации этих бактерий в присутствии антибиотика.

В дальнейшем в созданной модельной системе проводили оценку эффективности сочетанного применения антибиотика и потенциального ингибитора МБЛ из группы бисфосфонатов в отношении чувствительных к меропенему грамотрицательных микроорганизмов в присутствии стандартного реактива МБЛ. В опыт брали максимальную дозу МБЛ 0,28 ед. акт.,

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИНАКТИВАЦИИ МЕРОПЕНЕМА В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ ДОЗ СТАНДАРТНОГО РЕАКТИВА МБЛ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *A. BAUMANNII* ATCC ВАА-747

№ ряда	Количество фермента МБЛ, ед. акт. в ячейке	Количество меропенема, мкг/мл									
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
		Наличие роста тест-культуры (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05)									
1	0,28	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	0,14	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	0,07	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	0,035	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	0,0175	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
6	0,0088	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
7	0,0044	–	–	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р
8	0,0022	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Р
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747; «–» — отсутствие роста.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ МБЛ ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ В КОМПОЗИЦИИ С МЕРОПЕНЕМОМ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *P. AERUGINOSA* ATCC 27853

№ ряда	Количество этидроновой кислоты, мкг/мл	Количество меропенема, мкг/мл									
		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
		Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05)									
1	0	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	1563	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	3125	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р
4	6250	Р	–	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р
5	12 500	Р	–	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р
6	25 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	Р	Р
7	50 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	Р
8	100 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии субстрата МБЛ; «–» — отсутствие роста.

которая инактивирует максимальную тестируемую концентрацию антибиотика 512 мкг/мл. В ячейки, содержащие по 92,5 мкл разведения антибиотика, вносили по 92,5 мкл разведения этидроновой кислоты, затем добавляли по 5 мкл разведения реактива МБЛ 0,28 ед. акт. и по 10 мкл микробной взвеси.

В таблице 3 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в композиции с меропенемом в отношении тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853. В ячейках, где отсутствовал бисфосфонат, выявляли рост тест-штамма за счет инактивации антибиотика ферментом МБЛ (ячейка А1 — контроль культуры). Начиная с 3-го ряда наблюдали отсутствие роста тест-штамма в тех ячейках, где выявлен эффект ингибирования МБЛ этидроновой кислотой, что позволило меропенему проявить свой эффект.

В таблице 4 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в ком-

бинации с меропенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747. В ячейках без этидроновой кислоты отмечали рост тест-штамма за счет инактивации антибиотика ферментом МБЛ. Эффект ингибитора был отмечен со 2-го ряда, где его содержание составило 1563 мкг/мл. В ряду 8 выявлен эффект полной инактивации МБЛ этидроновой кислотой и отсутствие роста тест-культуры с дозами антибиотика до уровня референтного значения чувствительного тест-штамма — 2 мкг/мл.

На рисунке представлены кривые роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии реактива МБЛ (0,28 ед. акт.) при воздействии меропенема (2 мкг/мл) в сочетании с разными дозами этидроновой кислоты. Каждые 4 ч инкубации планшетов снимали показания оптической плотности микробной взвеси на ридере (n = 3, P < 0,05). Контролем служила смесь антибиотика, МБЛ и инокулята, в котором фермент подавлял активность меропенема, и при этом

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ МБЛ ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ В КОМБИНАЦИИ С МЕРОПЕНЕМОМ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *A. BAUMANNII* ATCC ВАА-747

№ ряда	Количество этидроновой кислоты, мкг/мл	Количество меропенема, мкг/мл									
		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
		Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ (экспозиция 24 часа, 37°C; n = 3, P < 0,05)									
1	0	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	1563	Р	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	3125	Р	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	6250	Р	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	12 500	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р
6	25 000	Р	–	–	–	–	–	–	Р	Р	Р
7	50 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	Р
8	100 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К

Примечание: «Р» — рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC ВАА-747 в присутствии субстрата МБЛ; «–» — отсутствие роста.

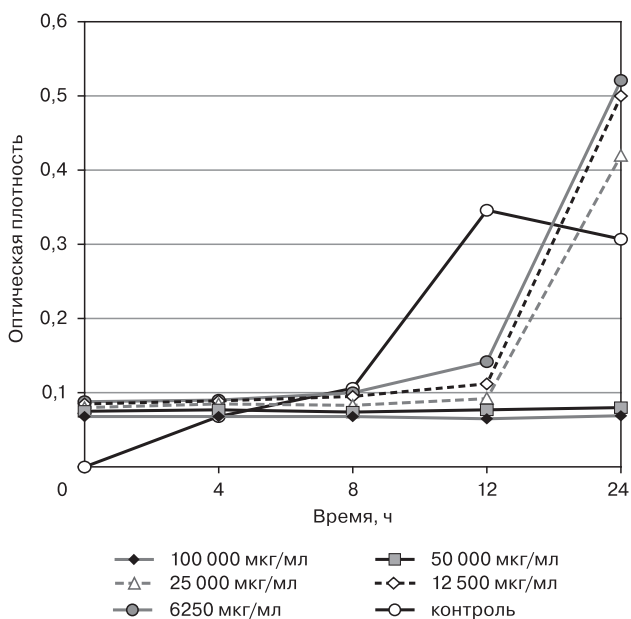


Рисунок. Динамика роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 в присутствии реактива МБЛ (0,28 ед. акт.) при воздействии сочетаний меропенема (2 мкг/мл) с разными концентрациями этидроновой кислоты

Примечания. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-культуры до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ, наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности.

наблюдали появление логарифмической фазы роста тест-штамма с начала эксперимента. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната, показана задержка появления логарифмической фазы роста тест-

культуры до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали МБЛ; наблюдали отсутствие логарифмической фазы роста микроба за счет действия меропенема на уровне референтного значения чувствительности.

При обосновании заключения об усилении действия меропенема в отношении резистентных клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов в присутствии этидроновой кислоты методом «шахматной доски» оценивали индекс фракционной ингибирующей концентрации (ФИК) по формуле:

$$\Sigma \text{ФИК} = \frac{\text{МПК}_{\text{ac}}}{\text{МПК}_a} + \frac{\text{МПК}_{\text{bc}}}{\text{МПК}_b},$$

где МПК_{ac} — минимальная концентрация антибиотика (в мкг/мл), взятого в сочетании с бисфосфонатом;

МПК_a — минимальная подавляющая концентрация антибиотика, взятого как монопрепарат (в мкг/мл);

МПК_{bc} — минимальная концентрация бисфосфоната (в мкг/мл), взятого в сочетании с антибиотиком;

МПК_b — минимальная подавляющая концентрация бисфосфоната, взятого как монопрепарат (в мкг/мл).

Авторами метода [28] предложена следующая трактовка индекса:

- синергизм — индекс до 0,5;
- индифферентность — индекс от 0,51 до 4;
- антагонизм — индекс более 4.

При использовании сочетаний этидроновой кислоты с меропенемом в отношении резистентного клинического изолята *P. aeruginosa* 532/14 выявлены следующие закономерности (табл. 5). В ячейке ДЗ выявлено минимальное увеличение чувствительности *P. aeruginosa*

ТАБЛИЦА 5. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *P. AERUGINOSA* 532/14 (МПК МЕРОПЕНЕМА 512 мкг/мл) К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ МЕРОПЕНЕМА И ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

	Этидроновая кислота, мкг/мл	Меропенем, мкг/мл										
		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
1	0	K1	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	781	Р	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	1563	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	3125	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	6250	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
6	12 500	Р	–	–	–	–	Р	Р	Р	Р	Р	Р
7	25 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	50 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	100 000	Р	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K2
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л

Примечание: «Р» — рост тест-культуры *P. aeruginosa* 532/14; «–» — отсутствие роста; K1 — контроль культуры, рост есть; K2 — контроль питательной среды, роста нет.

ТАБЛИЦА 6. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *A. baumannii* 346/14 (МПК МЕРОПЕНЕМА 512 мкг/мл) К СОЧЕТАННОМУ ДЕЙСТВИЮ МЕРОПЕНЕМА И ЭТИДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

	Этидроновая кислота, мкг/мл	Меропенем, мкг/мл											
		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
1	0	K1	–	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	781	P	–	–	–	–	P	P	P	P	P	P	P
3	1563	P	–	–	–	–	–	P	P	P	P	P	P
4	3125	P	–	–	–	–	–	P	P	P	P	P	P
5	6250	P	–	–	–	–	–	P	P	P	P	P	P
6	12 500	P	–	–	–	–	–	–	–	P	P	P	P
7	25 000	P	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	50 000	P	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	100 000	P	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K2
		A	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	

Примечание: «P» — рост тест-культуры *A. baumannii* 346/14; «-» — отсутствие роста, K1 — контроль культуры, роста есть, K2 — контроль питательной среды, роста нет.

532/14 к меропенему в 8 раз при сочетании с дозой этидроновой кислоты равной 1/128 МПК. Индекс ФИК составил 0,12, синергидный эффект. Необходимо отметить увеличение чувствительности тест-культуры к меропенему в 512 раз при сочетании с дозой бисфосфоната равной 1/8 МПК (ячейка Л7). Индекс ФИК при этом составил 0,12 (синергидный эффект).

В другой группе опытов изучали сочетанное действие бисфосфоната и меропенема в отношении тест-штамма *A. baumannii* 346/14 (табл. 6). Наблюдали усиление действия меропенема в 8 раз при сочетании с этидроновой кислотой в дозе 1/256 МПК (ячейка Д2). Индекс ФИК составил 0,13 (синергидный эффект). При сочетанном использовании препарата в дозе 1/8 МПК получили усиление действия меропенема в 512 раз (ячейка Л7), при этом индекс ФИК равен 0,13 (синергидный эффект).

Таким образом, выявлено синергидное действие бисфосфоната — этидроновой кислоты и меропенема в отношении резистентных штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14, продуцирующих МБЛ. Результаты 3 этапа наших исследований демонстрируют снижение высокого уровня резистентности к карбапенемам клинических штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14 в присутствии этидроновой кислоты в 8–512 раз (синергидный эффект).

Обсуждение и выводы

Во многом гидролитическая инактивация карбапенемов зависит от активности и количества МБЛ, образуемого микробом. Известны следующие ингибиторы МБЛ: этилендиаминотетраацетат [23], пиколиновая и малеиновая кислоты и их производные [8, 9]. В настоящее время не существует ингибиторов МБЛ из числа лекарственных средств, применяемых в клинике. В наших ранних работах изучена

возможность ингибирования МБЛ карбапенемрезистентных грамотрицательных микроорганизмов лекарственным средством из группы бисфосфонатов — клодроновой (дихлорметиленибисфосфоновой) кислотой, в дальнейшем изучали отечественный препарат — этидроновую кислоту.

Наиболее признанным, чаще применяемым способом определения чувствительности микроорганизмов к сочетанному действию двух антибиотиков является метод «шахматной доски», или перекрестного титрования. Кроме того, есть ряд работ по оценке наличия синергизма или антагонизма антибиотика и антимикробных агентов из групп четвертичных аммониевых соединений, ЭДТА [21, 31, 32, 39].

Мы модифицировали методику для оценки эффективности сочетанного применения антибиотика из группы карбапенемов и потенциального ингибитора МБЛ грамотрицательных бактерий.

На первом этапе данного исследования изучено повышение уровня МПК карбапенема в отношении ранее чувствительных к нему грамотрицательных бактерий в зависимости от дозы стандартного реактива МБЛ *P. aeruginosa*.

Полученные результаты позволили в дальнейшем в разработанной модельной системе изучить возможность потенциального ингибитора МБЛ — этидроновой кислоты, инактивировать стандартный реактив фермента и повышать эффективность меропенема в отношении ранее чувствительных к антибиотику грамотрицательных микробов. Выявлена инактивация фермента МБЛ даже малыми дозами бисфосфоната. На ридере ELx800 показана задержка логарифмической фазы роста тест-культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853 до 12 часов по сравнению с контролем. При этом максимальные дозы этидроновой кислоты 50 000–100 000 мкг/мл полностью ингибировали стандартный реак-

тив фермента МБЛ на протяжении 24 часов, что позволило меропенему проявить свою активность в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на уровне референтного значения чувствительности.

Результаты 3 этапа исследований демонстрируют синергидный эффект сочетанного применения этидроновой кислоты и меропенема в отношении клинических изолятов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14, продуцирующих МБЛ, с высоким уровнем резистентности к карбапенемам. При этом показано усиление действия меропенема по показателям его МПК в 8–512 раз, поэтому можно считать доказанным, что этидроновая кислота способна ингибировать МБЛ резистентных грамотрицательных микроорганизмов.

Таким образом, метод «шахматной доски» использован для создания модельной системы

с применением стандартного реактива фермента металло-бета-лактамазы *P. aeruginosa* рекомбинантной, экспрессированной в *E. coli*, для оценки эффективности потенциальных ингибиторов МБЛ. На разработанной модели показана способность отечественного лекарственного препарата этидроновой кислоты ингибировать МБЛ клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов, снижая при этом уровень МПК меропенема до референтного значения чувствительности.

Благодарности

Авторы выражают большую благодарность сотрудникам лаборатории бактериологических исследований ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России за помощь в проведении данного исследования.

Список литературы/References

1. Агеев В.А., Лазарева И.В., Сидоренко С.В. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения // Фарматека. 2015. № 14 (307). С. 9–16. [Ageevets V.A., Lazareva I.V., Sidorenko S.V. The problem of resistance to carbapenems: carbapenemases spread in the world and Russia, epidemiology, diagnosis, treatment options. *Farmateka = Pharmateka*, 2015, no. 14 (307), pp. 9–16. (In Russ.)]
2. Агеев В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Попенко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 3–4. С. 10–13. [Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsina E.S., Baturshin I.M., Popenko L.N., Shlyapnikov S.A., Ilyina E.N., Sidorenko S.V. Susceptibility of gram-negative carbapenemase-producing bacteria to various group antibiotics. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2013, vol. 58, no. 3–4, pp. 10–13. (In Russ.)]
3. Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Родионов Г.Г. «Метод шахматной доски» как тест для оценки снижения уровня резистентности грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам в присутствии бисфосфоната // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т. 17, № 1. С. 24–32. [Afinogenova A.G., Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Rodionov G.G. «Checkerboard array» as a test for evaluation of decrease in gram-negative bacteria resistance to carbapenems in the presence of bisphosphonate. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 24–32. (In Russ.)]
4. Белобородов В.В. Дезэскалационная антибактериальная терапия — концепция повышения эффективности лечения тяжелых инфекций // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12, № 5. С. 3–7. [Beloborodov V.V. De-escalation antibiotic therapy — concept improve the efficiency of the treatment of severe infections. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, vol. 12, no. 5, pp. 3–7. (In Russ.)]
5. Военно-полевая хирургия. Национальное руководство. Под ред. И.Ю. Быкова, Н.А. Ефименко, Е.К. Гуманенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 816 с. [Voенno-polevaya khirurgiya. Natsional'noe rukovodstvo. Pod red. I.Yu. Bykova, N.A. Efimenko, E.K. Gumanenko [Military field surgery. National guidance. Eds.: Bykov I.Yu., Efimenko N.A., Gumanenko E.K.]. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2009. 816 p.]
6. Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г., Мадай Д.Ю. Мониторинг ведущей микробиоты — возбудителей инфекционно-септических заболеваний в хирургии. Проблемы медицинской микологии. 2016. Т. 18, № 2. С. 52–53. [Voroshilova T.M., Afinogenov G.E., Afinogenova A.G., Maday D.Yu. Monitoring of leading microbiota — dominant agents of surgical infectious and septic diseases. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 52–53. (In Russ.)]
7. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Милукова И.А., Гельфанд Е.Б., Попов Т.В., Проценко Д.Н., Чурадзе Б.Т. Эпидемиологический мониторинг нозокомиальных инфекций // Инфекции в хирургии. 2013. Т. 11, № 1. С. 5–10. [Gelfand B.R., Belotserkovskiy B.Z., Milukova I.A., Gelfand E.B., Popov T.V., Protsenko D.N., Churadze B.T. Epidemiological monitoring of nosocomial infections. *Infektsii v khirurgii = Infections in Surgery*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 5–10. (In Russ.)]
8. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сузаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балде А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konvalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lubushkina M.I., Savochkina J.A., Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Ostankova Ju.V.,

- Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kõljalg S., Miciuleviciene J., Balode A. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo- β -lactamase NDM-1, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36 (In Russ.)
9. Патент 2462450 Российская Федерация, МПК C07C51/41, C07C57/42, C07C59/42, C07C69/60, C07C215/74, C07C219/02, C07C279/08, C07D207/02, C07D233/02, C07D241/08, A61K31/194, A61K31/341, A61K31/495, A61K45/08, A61K47/08, A61P31/04. Ингибиторы металло- β -лактамаз / Тикаути К., Ида М., Абе Т., Хирайва Ю., Морианака А., Кудо Т.; заявитель и патентообладатель Мейдзи Сейка Кайся, ЛТД. (JP). № 2008115512/04; заявл. 22.09.2006; опубл. 27.09.2012. [Patent 2462450 Russian Federation, IPC C07C51/41, C07C57/42, C07C59/42, C07C69/60, C07C215/74, C07C219/02, C07C279/08, C07D207/02, C07D233/02, C07D241/08, A61K31/194, A61K31/341, A61K31/495, A61K45/08, A61K47/08, A61P31/04. Inhibitory metallo- β -laktamaz [Metallo- β -lactamases inhibitors] / Tikauti K., Ida M., Abe T., Khiraiva Yu., Morinaka A., Kudo T.; appl. and patent holder Meidzi Seika Kaisya, Ltd. (JP). No. 2008115512/04; stat. 22.09.2006; publ. 27.09.2012]
 10. Поляк М.С. Антибиотикотерапия проблемных инфекций (преодоление резистентности). СПб.: Нестор-История, 2015. 488 с. [Polyak M.S. Antibiotikoterapiya problemnykh infektsii (preodolenie rezistentnosti) [Problem infections antibiotics therapy (resistance overcome)]. *St. Petersburg: Nestor-History*, 2015. 488 p.]
 11. Поляк М.С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии. СПб.: ООО «Анатолия», 2012. 256 с. [Polyak M.S. Laboratornoe obespechenie antibiotikoterapii [Antibiotic therapy laboratory support]. *St. Petersburg: Anatolia Ltd.*, 2012. 256 p.]
 12. Практическое руководство по антиинфекционной терапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Смоленск: МАКМАХ, 2007. 464 с. [Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoi terapii. Pod red. L.S. Strachunskogo, Yu.B. Belousova, S.N. Kozlova [Practical manual on anti-infective therapy. Eds. Strachunsky L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N.]. *Smolensk: IACMAC*, 2007. 464 p.]
 13. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1. Под ред. Лабинской А.С., Воиной Е.Г. М.: Издательство БИНОМ, 2008. 1080 с. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya. Kniga 1. Pod red. Labinskoi A.S., Volinoy E.G. [Medical microbiology guide. General and sanitary microbiology. Book 1. Eds. Labinskaya A.S., Volina E.G.]. *Moscow: Publishing house "BINOM"*, 2008. 1080 p.]
 14. Сидоренко С.В., Партина И.В., Агеевец В.А. Имипенем: 30 лет терапии // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 5–6. С. 55–61. [Sidorenko S.V., Partina I.V., Ageevets V.A. Imipenem: 30-year experience in therapy. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2013, vol. 58, no. 5–6, pp. 55–61. (In Russ.)]
 15. Тренин А.С. Методология поиска новых антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60, № 7–8. С. 34–46. [Trenin A.S. Methodology of screening new antibiotics: present status and prospects. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 7–8, pp. 34–46. (In Russ.)]
 16. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7, № 3. С. 271–285. [Schagenyan I.A., Tchernukha M.Ju. Nosocomial infections caused by non-fermenting gram-negative bacteria: epidemiological, microbiological and clinical features. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, vol. 7, no. 3, pp. 271–285. (In Russ.)]
 17. Щербук Ю.А., Мадай Д.Ю., Щербук А.Ю., Гармашов Ю.А., Мадай О.Д., Никитина Е.А. Комплексный подход к оценке тяжести состояния у больных с гнойно-воспалительными одонтогенными заболеваниями // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2014. Т. 173, № 5. С. 16–22. [Shcherbuk Yu.A., Madai D.Yu., Shcherbuk A.Yu., Garmashov Yu.A., Madai O.D., Nikitina E.A. Complex approach to assessment of condition severity in patients with pyoinflammatory odontogenous diseases. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Surgery Herald n.a. I.I. Grekov*, 2014, vol. 173, no. 5, pp. 16–22. (In Russ.)]
 18. Шляпников С.А., Насер Н.Р., Федорова В.В., Попенко Л.Н. Динамика антибиотикорезистентности актуальных для отделений интенсивной терапии и реанимации возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений и заболеваний // Инфекции в хирургии. 2013. Т. 11, № 1. С. 11–16. [Shlyapnikov S.A., Nasser N.R., Fedorova V.V., Popenko L.N. Analysis of dynamics of an antibiotic resistance of the actual infectious agents in intensive care units. *Infektsii v khirurgii = Infections in Surgery*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 11–16. (In Russ.)]
 19. Эдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Шевченко О.В., Тапальский Д.В., Азизов И.С., Д'соуза Дж.В., Тимохова А.В., Сухорукова М.В., Козырева В.К., Сафронова Е.В., Астахова М.В., Карпов И.А., Шамаева С.Х., Абрамова Н.В., Гординская Н.А., Козлов Р.С., исследовательская группа «МЕТАЛЛ». Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 2. С. 132–152. [Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Shevchenko O.V., Tapalski D.V., Azizov I.S., D'souza J.W., Timokhova A.V., Sukhorukova M.V., Kozyreva V.K., Safronova E.V., Astakhova M.V., Karpov I.A., Shamaeva S.Kh., Abramova N.V., Gordinskaya N.A., Kozlov R.S., "METALL" study group. Prevalence and molecular epidemiology of gram-negative bacteria producing metallo- β -lactamases (MBLs) in Russia, Belarus and Kazakhstan. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 132–152. (In Russ.)]
 20. Biedenbach D., Bouchillon S., Hackel M., Hoban D., Kazmierczak K., Hawser S., Badal R. Dissemination of NDM metallo- β -lactamase genes among clinical isolates of Enterobacteriaceae collected during the smart global surveillance study from 2008 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 826–830. doi: 10.1128/AAC.03938-14
 21. Berditsch M., Jager T., Stempel N., Schwartz T., Overhage J., Ulrich A.S. Synergetic effect of membrane-active peptides Polymyxin B and Gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 9, pp. 5288–5296. doi:10.1128/AAC.00682-15
 22. Bowers D.R., Cao H., Zhou J., Ledesma K.R., Sun D., Lomovskaya O., Tam V.H. Assessment of minocycline and polymyxin B combination against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 2720–2725. doi: 10.1128/AAC.04110-14

23. Bush K., Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 3, pp. 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09
24. Canton R., Akova M., Carmeli Y., Glupczynski C.G., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G.M., Samuelsen Q., Seifert H., Woodford N., Nordmann P. and the European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 413–431. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
25. Delgado-Valverde M., Sojo-Dorado J., Pascual A., Rodrigues-Bano J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Ther. Adv. Infect. Dis.*, 2013, vol. 1, no. 2, pp. 49–69. doi: 10.1177/2049936113476284
26. Drawz S., Bonomo R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 160–201. doi: 10.1128/CMR.00037-09
27. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 1, pp. 191–207. doi: 10.1128/CMR.00058-14
28. Eliopoulos G.M., Moellering R.C. «Antimicrobial combinations» in «Antibiotics in Laboratory Medicine». Ed. V. Lorian. 4th Edition. USA, Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1996, pp. 330–396.
29. Falagas M., Vardakas K., Kapaskelis A., Nikolaos R. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 5, pp. 455–460. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.12.031
30. Keepers T.R., Gomez M., Biek D., Critchley I., Krause K.M. Effect of in vitro testing parameters on ceftazidime-avibactam minimum inhibitory concentrations. *Int. Scholarly Res. Notices*, vol. 2015, Article ID 489547, 6 p. doi: 10.1155/2015/489547
31. Lambert R.J.W., Johnston M.D., Hanlon G.W., Denyer S.P. Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures — synergy or addition? *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 94, no. 4, pp. 747–759. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01908.x
32. Lambert R.J.W., Lambert R. A model for the efficacy of combined inhibitors. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 95, no. 4, pp. 734–743. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02039.x
33. Lim T.P., Cai Y., Hong Y., Chan E.C., Suranthran S., Teo J.Q., Lee W.H., Tan T.Y., Hsu L.Y., Koh T.H., Tan T.T., Kwa A.L. In vitro pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 2515–2524. doi: 10.1128/AAC.03639-14
34. Livermore D.M. Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2012, vol. 39, no. 4, pp. 283–294. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012
35. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
36. Ni W., Shao X., Di X., Cui J., Wang R., Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 1, pp. 8–18. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.10.002
37. Paul M., Carmeli Y., Durante-Mangoni E., Mouton J.W., Tacconelli E., Theuretzbacher U., Mussini C., Leibovici L. Combination therapy for carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, no. 9, pp. 2305–2309. doi: 10.1093/jac/dku168
38. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 45, no. 6, pp. 568–585. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001
39. Soren O., Brinch K.S., Patel D., Liu Y., Liu A., Coates A., Hu Y. Antimicrobial peptide Novicidin synergizes with Rifampin, Ceftriaxone and Ceftazidime against antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 10, pp. 6233–6240. doi: 10.1128/AAC.01245-15

Авторы:

Афиногенова А.Г., д.б.н., руководитель испытательного лабораторного центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

Ворошилова Т.М., врач-бактериолог, зав. лабораторией бактериологических исследований ФГБУ Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;

Афиногенов Г.Е., д.м.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

Мадай Д.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Afinogenova A.G., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory Testing Centre, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Voroshilova T.M., Bacteriologist, Head of Bacterial Laboratory, The Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Afinogenov G.E., PhD, MD (Medicine), Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Maday D.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.