

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* — ПРОДУЦЕНТОВ КАРБАПЕНЕМАЗ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ БЕЛАРУСИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ, ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

Д.В. Тапальский¹, О.И. Савченко², Н.А. Бонда³

¹ УО Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

² Гомельская областная клиническая больница, г. Гомель, Беларусь

³ ГУ Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель, Беларусь

Резюме. Охарактеризована распространенность карбапенемаза-продуцирующих *Klebsiella pneumoniae* в организациях здравоохранения, определена их чувствительность к антимикробным препаратам (АМП), комбинациям антимикробных препаратов, дезинфектантам. В рамках программы микробиологического мониторинга отобрано 58 клинических изолятов *K. pneumoniae*, нечувствительных к карбапенемам и/или полимиксидам. Гены, кодирующие карбапенемазы групп KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM, выявлялись методом мультиплексной ПЦР в реальном времени. Чувствительность к антимикробным препаратам определялась автоматизированным методом на микробиологическом анализаторе «VITEK-2 Compact» (bioMérieux, Франция) и методом последовательных микроразведений в бульоне. Определение чувствительности к 11 двойным комбинациям антимикробных препаратов выполнено модифицированным методом тестирования бактерицидности различных комбинаций. В составе комбинаций тестировали АМП, взятые в пороговых фармакокинетических/фармакодинамических (ФК/ФД) концентрациях: меропенем — 8 мкг/мл, амикацин — 16 мкг/мл, левофлоксацин — 1 мкг/мл, тигециклин — 0,5 мкг/мл, фосфомицин — 32 мкг/мл, колистин — 2 мкг/мл. Чувствительность к 7 комбинированным дезинфицирующим средствам различного состава определена суспензионным методом. Присутствие генов карбапенемаз выявлено у 22 клинических изолятов *K. pneumoniae*. Из них 19 изолятов содержали ген *bla*_{OXA-48}, и 3 изолята — ген *bla*_{NDM}. Продуценты карбапенемаз выявлены в 10 организациях здравоохранения Гомеля и пяти районных центрах Гомельской области. Большинство изолятов *K. pneumoniae* с продукцией карбапенемаз были выделены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии (63,6%) и отделения хирургического профиля (27,3%). Наибольшую активность в отношении карбапенемаза-продуцирующих *K. pneumoniae* проявляли тигециклин (100% чувствительных изолятов, МПК₅₀ — 1 мкг/мл, МПК₉₀ — 1 мкг/мл) и колистин (86,4% чувствительных изолятов, МПК₅₀ — 0,5 мкг/мл, МПК₉₀ — 4 мкг/мл), наименьшую — аминопенициллины, цефалоспорины, азтреонам, аминогликозиды, фторхинолоны, хлорамфеникол (чувствительные изоляты отсутствовали). Отмечена бактерицидная актив-

Адрес для переписки:

Тапальский Дмитрий Викторович
246050, Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5,
Гомельский государственный медицинский университет.
Тел.: +375 297 35-42-93. Факс: +375 232 75-31-21.
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Contacts:

Dmitriy V. Tapalski
246050, Belarus, Gomel, Lange str., 5,
Gomel State Medical University.
Phone: +375 297 35-42-93. Fax: +375 232 75-31-21.
E-mail: tapalskiy@gsmu.by

Библиографическое описание:

Тапальский Д.В., Савченко О.И., Бонда Н.А. Распространенность *Klebsiella pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз в Гомельской области Беларуси и их чувствительность к антибиотикам, комбинациям антибиотиков, дезинфектантам // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 671–679. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-671-679

Citation:

Tapalski D.V., Savchenko O.I., Bonda N.A. Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Gomel Region of Belarus and their sensitivity to antibiotics, antibiotic combinations, and decontaminants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 671–679. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-671-679

ность всех комбинаций антимикробных препаратов с включением колистина (меропенем–колистин, амикацин–колистин, левофлоксацин–колистин, тигециклин–колистин, фосфомицин–колистин) в отношении 86,4–95,5% исследуемых изолятов *K. pneumoniae*. Для 21 изолята (95,5%) *K. pneumoniae* выявлено не менее 3 различных комбинаций антимикробных препаратов с бактерицидной активностью. Для одного изолята (продуцента МБЛ NDM с МПК колистина 32 мкг/мл) выявлена только 1 бактерицидная комбинация (меропенем–амикацин). Среди карбапенемаза-продуцирующих *K. pneumoniae* не обнаружено изолятов, устойчивых к рабочим концентрациям какого-либо из включенных в исследование дезинфектантов. В концентрации $\frac{1}{4}$ от рабочей оказывали бактерицидное действие на все изоляты гексадекон, дуацид, оксидез, хлороцид, диайсид. В концентрации $\frac{1}{16}$ от рабочей дуацид, оксидез, хлороцид, диайсид оказывали бактерицидное действие на 95,5–100% изолятов. Таким образом, несколько групп дезинфектантов (окислители, хлорсодержащие препараты) обладали бактерицидной активностью в отношении множественно- и экстремально-резистентных изолятов *K. pneumoniae* даже в концентрациях в 4–16 раз ниже рекомендованных.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антимикробная резистентность, карбапенемаза, полимиксины, комбинации антибиотиков, дезинфектанты.

PREVALENCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN GOMEL REGION OF BELARUS AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS, ANTIBIOTIC COMBINATIONS, AND DECONTAMINANTS

Tapalski D.V.^a, Savchenko O.I.^b, Bonda N.A.^c

^a Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

^b Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Belarus

^c Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus

Abstract. Here, we characterized in public health organizations prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, sensitivity to antimicrobial agents (AMAs), combined antimicrobial agents, and decontaminants. For this, there were selected 58 clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and/or polymyxins and examined within the microbiological monitoring program. Genes encoding KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM carbapenemases were detected by real-time multiplex PCR. Sensitivity to antimicrobial agents was determined by an automated method on a microbiological VITEK-2 Compact analyzer (bioMérieux, France) and by serial broth microdilution method. Sensitivity to 11 dual antimicrobial agent combinations was determined by a modified method of multiple combination bactericidal antibiotic testing. As a part of combinations, AMAs at pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) threshold concentrations (meropenem — 8 µg/ml, amikacin — 16 µg/ml, levofloxacin — 1 µg/ml, tigecycline — 0.5 µg/ml, phosphomycin — 32 µg/ml, colistin — 2 µg/ml) were tested. Susceptibility to 7 combined decontaminants of different composition was determined by the suspension method. Carbapenemase genes were detected in 22 *K. pneumoniae* clinical isolates, of which 19 isolates contained a *bla*_{OXA-48} gene and 3 isolates — gene *bla*_{NDM}. Carbapenemase producing *K. pneumoniae* were identified in 10 Gomel public health organizations and five regional centers of the Gomel region. The majority of such strains were isolated from patients in ICU (63.6%) and surgical departments (27.3%). Tigecycline (100% of the sensitive isolates, MIC₅₀ — 1 µg/ml, MIC₉₀ — 1 µg/ml) and colistin (86.4% of the sensitive isolates, MIC₅₀ — 0.5 µg/ml, MIC₉₀ — 4 µg/ml) exhibited the highest activity against carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, whereas aminopenicillins, cephalosporins, aztreonam, aminoglycosides, fluoroquinolones, chloramphenicol (no sensitive isolates) had exhibited the lowest efficacy. Bactericidal activity of all antibiotic combinations containing colistin was shown against 86.4–95.5% of *K. pneumoniae* isolates. At least 3 distinct combinations of antimicrobial agents with bactericidal activity were efficient against 21 *K. pneumoniae* isolates (95.5%). Only 1 bactericidal combination (meropenem–amikacin) was unveiled for one isolate (producer of NDM MBL with MIC of colistin 32 µg/ml). Geksadekon, duacid, oksidez, hlorocid and diajsid exerted a bactericidal effect at $\frac{1}{4}$ work dose against all isolates. Duacid, oksidez, hlorocid and diajsid showed bactericidal effect at $\frac{1}{16}$ work dose against 95.5–100% isolates. Thus, several decontaminant groups (oxidizing agents, chlorine-containing preparations) were characterized by bactericidal activity against multidrug-resistant and extremely drug-resistant of *K. pneumoniae* even at 4–16 times lower than recommended concentration.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, carbapenemase, polymyxins, combinations of antibiotics, disinfectants.

Введение

Клиническая значимость *K. pneumoniae* связана как с широкой распространенностью в госпитальной среде, так и с исключительной способностью быстрого формирования при-

обретенной резистентности к антимикробным препаратам (АМП) разных классов (входит в группу наиболее проблемных возбудителей — ESKAPE) [14]. Карбапенемы являются одними из наиболее эффективных препаратов для лечения инфекций, связанных с оказани-

ем медицинской помощи (ИСМП), вызванных грамотрицательными возбудителями. Начиная с середины 2000-х гг. в мире отмечено широкое распространение резистентности к карбапенемам, связанное с различными механизмами, и, в первую очередь, с продукцией приобретенных карбапенемаз. Расположение генов карбапенемаз на мобильных генетических элементах значительно упрощает их горизонтальную передачу, а сцепление с детерминантами устойчивости к АМП разных классов часто приводит к формированию экстремальной антибиотикорезистентности [15].

В настоящее время из всех доступных на фармацевтическом рынке Беларуси АМП только колистин сохраняет приемлемую микробиологическую активность в отношении большинства карбапенеморезистентных госпитальных изолятов *K. pneumoniae* [5]. Фармакокинетические и фармакодинамические особенности колистина детально изучены только в последние 5 лет. Использование стандартных режимов дозирования часто не позволяет быстро достичь адекватных концентраций антибиотика в очаге инфекции, что приводит к клинической неэффективности терапии и может способствовать селекции резистентности. Поэтому колистин назначается в сочетании с другими антибиотиками в расчете на аддитивное или синергидное действие комбинированной антибактериальной терапии [2].

Распространение в госпитальной среде экстремально-антибиотикорезистентных (XDR — extensively drug resistance) *K. pneumoniae* и появление отдельных панрезистентных (PDR — pandrug resistance) изолятов значительно затрудняет проведение антибактериальной терапии и требует назначения комбинаций из двух и более АМП. Описаны комбинации АМП, *in vitro* обладающие синергидным действием в отношении карбапенеморезистентных энтеробактерий [19]. В ходе многочисленных исследований было показано, что эффект сочетанного использования АМП для лечения инфекций, вызванных XDR и PDR возбудителями, трудно прогнозируем в связи с возможным присутствием разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам из одной группы. Поэтому для подбора эффективных комбинаций АМП следует проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного больного [8]. На основе разработанного в 2000 г. в Канаде метода МСВТ (Multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций) [7], с учетом современных данных о фармакокинетике и фармакодинамике АМП, нами создан и адаптирован микробиологический метод, позволяющий подбирать эффективные комбинации из двух

или трех АМП, обладающие бактерицидной активностью в отношении XDR бактерий [4]. В отличие от существующих методов, тестирование проводится для фиксированных концентраций АМП, аналогичных фармакокинетическим/фармакодинамическим (ФК/ФД) концентрациям, создаваемым в организме при назначении стандартных терапевтических доз.

В 2012 г. Центр по контролю и профилактике заболеваний США издал «Руководство по контролю над карбапенеморезистентными энтеробактериями» («Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae»), которое определяет комплекс мероприятий, направленных на ограничение циркуляции XDR энтеробактерий в стационарах [9]. В 2014 г. Европейским обществом по клинической микробиологии и инфекционным болезням было опубликовано похожее руководство [17]. В обоих документах указывается на роль объектов госпитальной среды в качестве факторов передачи возбудителей ИСМП, а также на важность проведения дезинфекции с использованием препаратов, активных в отношении целевых патогенов. У грамотрицательных бактерий возможно развитие перекрестной резистентности к дезинфицирующим средствам (ДС) и ряду АМП, связанное с присутствием общих молекулярных механизмов устойчивости или сцеплением генетических детерминант устойчивости к биоцидам различных типов [10]. Вместе с тем, для ДС не определены пограничные значения минимальных бактерицидных концентраций, поэтому интерпретация результатов определения устойчивости к этим препаратам затруднена. В работе М. Reichel и соавт. было показано, что все ДС для дезинфекции поверхностей (на основе спиртов, альдегидов, поверхностно-активных веществ, окислителей) оказывали бактерицидное действие как на антибиотикочувствительные изоляты грамотрицательных бактерий, так и на XDR- и PDR-изоляты, продуцирующие карбапенемазы различных классов [16]. Однако при проведении сопоставления минимальных бактерицидных концентраций (МБК) глутарового альдегида, бензалкония хлорида, хлоргексидина ацетата, этанола для контрольного штамма *K. pneumoniae* ATCC700603 и 27 карбапенеморезистентных XDR и PDR штаммов *K. pneumoniae*, для 52–78% антибиотикорезистентных штаммов выявлено превышение МБК ДС в 2–8 раз по сравнению с контролем [12]. В отечественной литературе имеется большое количество сведений о низкой активности ДС в отношении клинических изолятов микроорганизмов, сделаны попытки оценить взаимосвязь антибиотикорезистентности микроорганизмов и их устойчивости к ДС [1, 6]. Необходима количественная оценка бакте-

рицидной активности ДС в отношении XDR-изолятов *K. pneumoniae* с целью выбора наиболее эффективных препаратов.

Цель исследования — оценить распространенность *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз различных типов в организациях здравоохранения Гомельской области, а также определить их чувствительность к АМП, комбинациям АМП, дезинфектантам.

Материалы и методы

При проведении рутинных микробиологических исследований в 2016–2017 гг. (IV квартал 2016 г. — III квартал 2017 г.) из клинического материала пациентов, госпитализированных в 10 организаций здравоохранения г. Гомеля, был выделен 351 изолят *K. pneumoniae*. Из этого количества для выполнения дальнейших исследований отобрано 39 клинических изолятов *K. pneumoniae*, нечувствительных (устойчивых или умеренно устойчивых) к карбапенемам и/или полимиксинам. Еще 19 XDR-изолятов *K. pneumoniae* были выделены в аналогичный период времени в микробиологических лабораториях 5 территориальных (районных и зональных) центров гигиены и эпидемиологии Гомельской области от пациентов, находившихся на лечении в 5 центральных районных больницах. Все изоляты были выделены из различных видов клинического материала — мокроты, крови, раневого отделяемого, экссудатов, интраоперационного материала, мочи в диагностически значимых количествах.

Для всех изолятов выполнена реидентификация с использованием автоматического микробиологического анализатора «VITEK 2 Compact» на идентификационных картах VITEK 2 GN (bioMérieux, Франция). Определение чувствительности к 18 АМП выполнено на анализаторе «VITEK 2 Compact» с использованием диагностических карт AST-N215 и AST-XN05 в соответствии с инструкциями производителя. После реидентификации штаммы помещались в рабочую коллекцию и хранились в триптон-соевом бульоне (BD, США) с добавлением 30% глицерина в замороженном состоянии при -70°C .

Поскольку определение чувствительности к колистину с помощью автоматизированных систем не позволяет получать надежные результаты [18], для получения истинных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) дополнительно был использован метод последовательных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон (BD, США). Также определяли МПК для меропенема и тигециклина. Тестирование проводили в соответствии с ISO 20776-1:2006 [13]. При учете и интерпретации результатов руководствовались стан-

дартами EUCAST [11]. Качество исследований контролировали штаммами *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Детекцию генов KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM выполняли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Определение чувствительности к комбинациям АМП выполняли модифицированным методом тестирования бактерицидности различных комбинаций [4]. В составе двойных комбинаций тестировали АМП, взятые в пороговых ФК/ФД концентрациях: меропенем — 8 мкг/мл, амикацин — 16 мкг/мл, левофлоксацин — 1 мкг/мл, тигециклин — 0,5 мкг/мл, фосфомицин — 32 мкг/мл, колистин — 2 мкг/мл.

Для штаммов с выявленной продукцией карбапенемаз выполнено определение чувствительности к ДС, зарегистрированным и используемым в организациях здравоохранения Республики Беларусь. Применяли суспензионный метод, приведенный в Федеральных клинических рекомендациях «Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях» [3] с некоторыми изменениями. Из суточных культур исследуемых микроорганизмов, выращенных на плотной питательной среде, в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили бактериальную суспензию с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Для унификации эксперимента выбирали рекомендованные производителем рабочие концентрации для дезинфекции изделий медицинского назначения в бактерицидном режиме обеззараживания в 30-минутной экспозиции. В таблице приведены сведения о включенных в исследования ДС, их составе и рекомендованных производителем концентрациях рабочих растворов. Растворы ДС готовили в стерильной дистиллированной воде. Дополнительно готовили растворы с концентрациями $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{16}$ от рабочих.

Приготовленные растворы ДС вносили в объеме 180 мкл в лунки полистироловых 96-луночных планшетов и добавляли 20 мкл бактериальной суспензии. Инкубацию выполняли при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации в каждую лунку вносили по 100 мкл стерильного раствора универсального нейтрализатора, содержащего 3% твина-80, 30 мг/мл сапонины, 5 мг/мл тиосульфата натрия, 1 мг/мл гистидина, 1 мг/мл цистеина.

Для количественной оценки бактерицидного эффекта делали высеивание 10 мкл содержи-

мого каждой лунки на сектор питательной среды (агар Мюллера–Хинтон). Выполняли инкубацию 24 ч при 35°C, после чего оценивали наличие роста. При росте 1 и более колонии на секторе питательной среды микроорганизм считали устойчивым к действию данной концентрации ДС.

Результаты

Из 58 отобранных для исследования изолятов *K. pneumoniae* присутствие генов карбапенемаз выявлено у 22 (37,9%). Из них 19 изолятов содержали ген *bla*_{OXA-48}, и 3 изолята — ген *bla*_{NDM}. Продукты карбапенемаз были выявлены в 10 организациях здравоохранения г. Гомеля и пяти районных центрах Гомельской области (Добрушского, Жлобинского, Петриковского, Речицкого и Рогачевского), при этом в одной организации здравоохранения г. Гомеля выявлена параллельная циркуляция продуцентов карбапенемазы OXA-48 (4 изолята на протяжении одного года) и МБЛ NDM (2 изолята). Большинство изолятов *K. pneumoniae* с про-

дукцией карбапенемаз были выделены от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии (63,6%) и отделения хирургического профиля (27,3%). Продукты карбапенемаз были выделены из мокроты и промывных вод бронхов (12 изолятов — 54,5%), раневого отделяемого и интраоперационного материала (6 изолятов — 27,3%), мочи (3 изолята — 13,6%) и крови (1 изолят — 4,5%).

Гистограммы распределения МПК тигециклина, колистина и меропенема представлены на рисунках 1–3. В отношении исследуемых изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз наибольшей активностью обладали тигециклин (чувствительны все изоляты, МПК₅₀ — 1 мкг/мл, МПК₉₀ — 1 мкг/мл) и колистин (чувствительны 86,4% изолятов, МПК₅₀ — 0,5 мкг/мл, МПК₉₀ — 4 мкг/мл). Выявлен 1 изолят *K. pneumoniae* с МПК колистина 32 мкг/мл, являющийся продуцентом МБЛ NDM (значение МПК в 8 раз превышает рекомендованную EUCAST пограничную концентрацию). Для меропенема значение МПК₅₀ составило 64 мкг/мл,

Таблица. Состав и рабочие концентрации исследуемых дезинфицирующих средств

Table. Composition and working concentrations of disinfectants

Наименование Name	Состав Composition	Концентрация для рабочего раствора, % Concentration for working solution, %	Экспозиция, мин Exposition, minutes
Виродез Virodez	триамин, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), неионогенное поверхностно-активное вещество (НПАВ) triamine, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, quaternary ammonium compounds (QAC), nonionic surface-active agent (NSAA)	0,25	30
Гексадекон Geksadekon	смесь альдегидов и органических кислот, ЧАС, НПАВ mixture of aldehydes and organic acids, QAC, NSAA	0,5	30
Гликодез Glikodez	гликолевая кислота, ЧАС, НПАВ glycolic acid, QAC, NSAA	0,25	30
Дуацид Duacid	полигексаметиленбигуанида гидрохлорид, ЧАС, изопропиловый спирт, НПАВ polyhexamethylenebiguanide hydrochloride, QAC, isopropyl alcohol, NSAA	0,5	30
Оксидез Oksidez	перекись водорода, полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, НПАВ hydrogen peroxide, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, NSAA	0,5	30
Хлороцид Hlorocid	натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты sodium dichloroisocyanurate	0,2 (по активному хлору) (for active chlorine)	30
Диайсид Diajsid	надлимонная кислота, лимонная кислота, надмолочная кислота, молочная кислота, НПАВ supra-citric acid, citric acid supra-lactic acid, lactic acid, NSAA	0,25	30

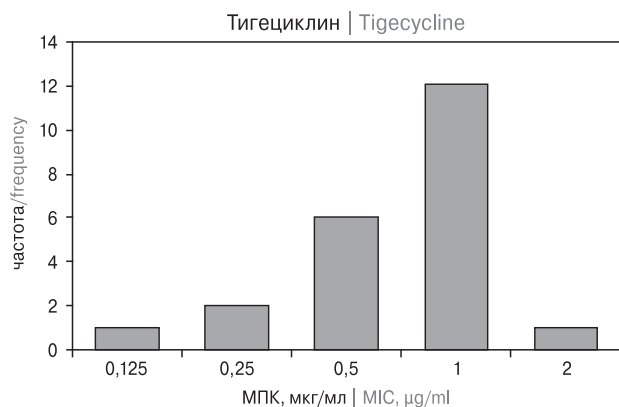


Рисунок 1. Распределение МПК тигециклина для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 1. Distribution of MIC of tigecycline for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

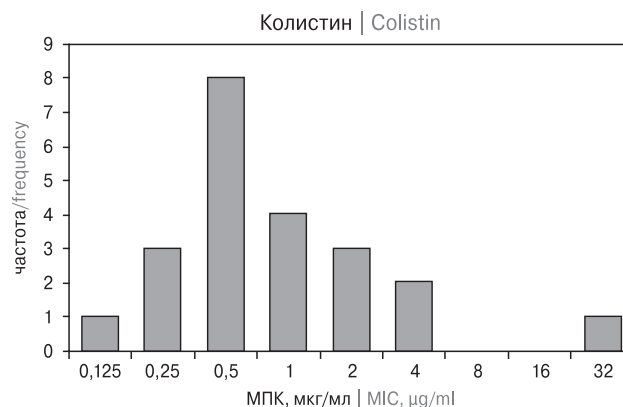


Рисунок 2. Распределение МПК колистина для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 2. Distribution of MIC of colistin for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

МПК₉₀ — 128 мкг/мл. В соответствии с интерпретационными критериями EUCAST [11], 2 изолята сохраняли чувствительность к меропенему (МПК 2 мкг/мл, оба — продуценты карбапенемазы ОХА-48). По результатам, полученным с использованием автоматического микробиологического анализатора, среди продуцентов карбапенемаз не выявлено изолятов, чувствительных к аминопенициллинам, цефалоспорином, азтреонаму, аминогликозидам, фторхинолонам, хлорамфениколу. Сохраняли чувствительность к тетрациклину 68,2% изолятов, к триметоприму/сульфаметоксазолу — 13,6% изолятов.

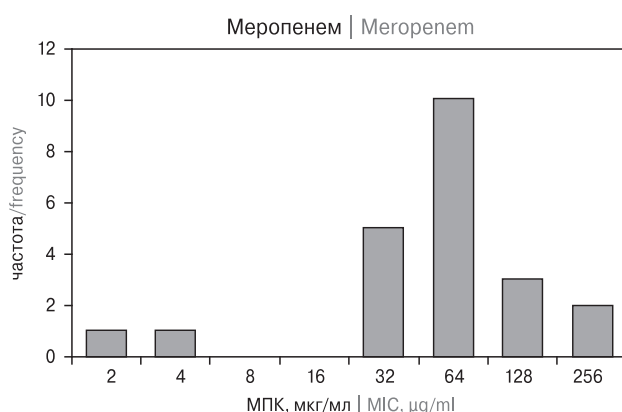


Рисунок 3. Распределение МПК меропенема для клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, выделенных в Гомельской области

Figure 3. Distribution of MIC of meropenem for clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases isolated in the Gomel region

Результаты тестирования 11 комбинаций АМП в отношении 22 клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз представлены на рисунке 4. Для 21 изолята (95,5%) *K. pneumoniae* выявлено не менее 3 различных комбинаций АМП с бактерицидной активностью. Для одного изолята (продуцент МБЛ NDM, устойчивость к колистину с МПК 32 мкг/мл) выявлена только 1 бактерицидная комбинация АМП (меропенем—амикацин). Отмечена бактерицидная активность всех комбинаций с включением колистина (меропенем—колистин, амикацин—колистин, левофлоксацин—колистин, тигециклин—колистин, фосфомицин—колистин) в отношении 86–95% исследуемых *K. pneumoniae*, что может быть связано с невысокими значениями МПК колистина для большинства изолятов. Комбинации меропенема с фосфомицином, левофлоксацином, амикацином проявляли бактерицидную активность в отношении всего 2–3 изолятов, 2 из которых, несмотря на продукцию карбапенемазы ОХА-48, формально сохраняли чувствительность к меропенему (МПК 2 мкг/мл). Интересно, что при отсутствии в тестируемой выборке устойчивости к тигециклину, комбинации меропенем—тигециклин и амикацин—тигециклин оказывали бактерицидное действие только на 2 и 1 изолят соответственно, что может быть связано с бактериостатическим типом действия тигециклина.

Результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз к ДС представлены на рисунке 5. Не обнаружено изолятов, устойчивых к рабочей концентрации какого-либо из включенных в исследование ДС. В концентрации 1/4 от рабочей оказывали бак-

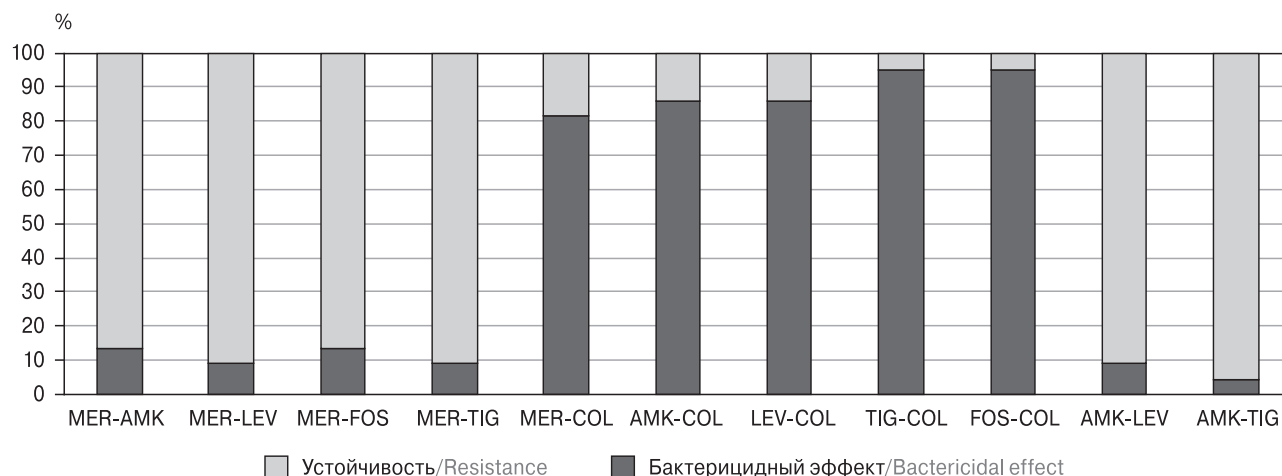


Рисунок 4. Эффективность различных комбинаций из двух антибактериальных препаратов в отношении клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз

Figure 4. The effectiveness of various combinations of two antibacterial drugs against clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases

Примечание. MER — меропенем, AMK — амикацин, LEV — левофлоксацин, FOS — фосфомицин, TIG — тигециклин, COL — колистин.

Note. MER — meropenem, AMK — amikacin, LEV — levofloxacin, FOS — phosphomycin, TIG — tigecycline, COL — colistin.

террицидное действие на все изоляты 5 из 7 ДС (гексадекон, дуацид, оксидез, хлороцид, диаисид), при этом 4 из них (дуацид, оксидез, хлороцид, диаисид) также проявляли бактерицидную активность в концентрации $1/16$ от рабочей в отношении 95,5–100% исследуемых изолятов.

Обсуждение

Обнаружено широкое распространение MDR и XDR изолятов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенем-гидролизующие ферменты, в орга-

низациях здравоохранения в Гомельской области. Так, в Гомеле продукция карбапенемаз выявлена у 4,0% клебсиелл, выделенных от госпитализированных пациентов. Настораживает факт выявления инфекций, вызванных XDR карбапенемазопродуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, в относительно небольших организациях здравоохранения, расположенных в районных центрах с численностью населения от 10 до 70 тыс. человек. Продуценты карбапенемазы OXA-48 были выделены в 4 районных центрах Гомельской области, еще в одном рай-

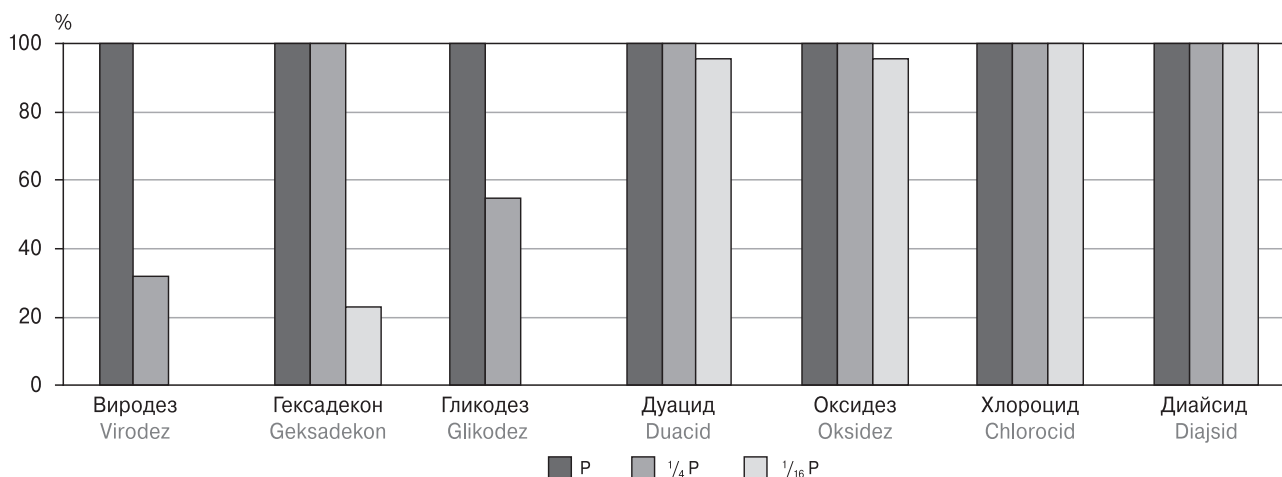


Рисунок 5. Чувствительность к дезинфицирующим средствам клинических изолятов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз (% чувствительных изолятов)

Figure 5. Sensitivity to disinfectants of clinical isolates of *K. pneumoniae* — producers of carbapenemases (% of sensitive isolates)

Примечание. P — рабочая концентрация, $1/4$ P — концентрация $1/4$ от рабочей, $1/16$ P — концентрация $1/16$ от рабочей.

Note. P — working concentration, $1/4$ P — concentration $1/4$ from working, $1/16$ P — concentration $1/16$ from working.

онном центре выявлен продуцент МБЛ NDM с развившейся устойчивостью к полимиксинам (МПК колистина 32 мкг/мл).

Использование комбинации АМП зачастую является единственно возможным способом преодолеть экстремальную антибиотикорезистентность возбудителя и обеспечить благоприятный исход заболевания. В многочисленных исследованиях установлено, что для подбора эффективных комбинаций АМП целесообразно проводить микробиологическое тестирование бактериальных изолятов, выделенных от конкретного пациента. В Беларуси тестирование эффективности комбинаций АМП до настоящего времени не проводилось, что было связано с отсутствием доступных методик и подготовленных кадров. Внедрение модифицированного метода тестирования бактерицидности различных комбинаций, основанного на определении чувствительности к комбинациям АМП в пороговых ФК/ФД концентрациях, позволило выполнять рутинные исследования с целью назначения комбинированной антибиотикотерапии конкретному пациенту. С использованием описанного метода удалось подобрать эффективные комбинации АМП для всех включенных в исследование карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae*, при этом для 95,5% изолятов выявлено не менее 3 различных комбинаций АМП с бактерицидной активностью.

Показано отсутствие устойчивости MDR- и XDR-изолятов *K. pneumoniae* к различным ДС, взятым в рекомендованных производителями рабочих концентрациях. Ограничением использованного нами метода является тестирование коммерчески доступных комбиниро-

ванных препаратов для дезинфекции, а не отдельных их компонентов, и, как следствие, невозможность определения МБК для входящих их состав биоцидных веществ. Тем не менее, выполненное исследование позволяет выделить несколько групп ДС (окислители, хлорсодержащие препараты), обладающие выраженной активностью в отношении MDR- и XDR-изолятов *K. pneumoniae* даже в концентрациях, которые 4–16 раз ниже рекомендованной производителем. Требуется проведение дальнейших исследований для количественной оценки формирования устойчивости госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий с XDR-фенотипом к ДС различных групп.

Благодарности

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Москва) Ю.А. Савочкиной за предоставленные наборы для выявления генов карбапенемаз, заведующему научно-исследовательской лабораторией Гомельского государственного медицинского университета О.В. Осипкиной за помощь в организации и проведении молекулярно-генетических исследований.

Исследование выполнено в рамках задания «Внедрение в практику здравоохранения Гомельской области системы микробиологического тестирования комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных возбудителей бактериальных инфекций», заказчик — Управление здравоохранения Гомельского областного исполнительного комитета, № госрегистрации 20164463 от 05.12.2016.

Список литературы/References

1. Сергевнин В.И., Клюкина Т.В., Волкова Э.О. Приобретенная устойчивость возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим средствам и антибиотикам // Здоровье населения и среда обитания. 2013. Т. 244, № 7. С. 35–37. [Sergevnin V.I., Klyukina T.V., Volkova E.O. Acquired resistance of pathogens of nosocomial purulent-septic infections to disinfectants and antibiotics. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Health of the Population and Habitat*, 2013, vol. 244, no. 7, pp. 35–37. (In Russ.)]
2. Соловей Н.В., Карпов И.А., Горбич Ю.Л. Терапия мультирезистентных грамотрицательных инфекций: ренессанс колистина // Клиническая инфектология и паразитология. 2012. Т. 1, № 1. С. 12–27. [Solovey N.V., Karpov I.A., Gorbich Yu.L. Therapy of multiresistant gram-negative infections: the renaissance of colistin. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya = Clinical Infectology and Parasitology*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 12–27. (In Russ.)]
3. Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях: Федеральные клинические рекомендации. М., 2015. 27 с. [Method for determining the sensitivity of bacteria to disinfectants in monitoring the resistance to antimicrobial agents in medical organizations: Federal clinical guidelines. *Moscow*, 2015. 27 p. (In Russ.)]
4. Тапальский Д.В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. Т. 20, № 3. С. 182–191. [Tapalski D.V. Susceptibility to antibiotic combinations among nosocomial carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 182–191. (In Russ.)]
5. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О., Савельева А.К., Козловская И.В., Козик А.П., Левшина Н.Н., Осипкина О.В., Соловей Н.В., Карпов И.А. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси // Здравоохранение. 2017. № 3. С. 40–47. [Tapalsky D.V.,

- Osipov V.A., Yevseyenko E.O., Saveliyeva A.K., Kozlovskaya I.V., Kozik A.P., Levshina N.N., Osipkina O.V., Solovey N.V., Karpov I.A. Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extensively antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: occurrence in Belarus. *Zdravookhranenie = Health Care*, 2017, no. 3, pp. 40–47. (In Russ.)
6. Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благодорова А.С., Широкова И.Ю., Кулюкина А.А. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы // Медицинский альманах. 2012. Т. 22, № 3. С. 122–125. [Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V., Blagodorova A.S., Shirokova I.Yu., Kulyukina A.A. The regional monitoring of microorganisms resistance to disinfectants: results and perspectives. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 122–125. (In Russ.)]
 7. Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A., Speert D.P., Macdonald N.E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, vol. 161, no. 4, pp. 1206–1212. doi: 10.1164/ajrccm.161.4.9907147
 8. Cai Y., Chua N.G., Lim T.P., Teo J.Q., Lee W., Kurup A., Koh T.H., Tan T.T., Kwa A.L. From bench-top to bedside: a prospective in vitro antibiotic combination testing (iACT) service to guide the selection of rationally optimized antimicrobial combinations against extensively drug resistant (XDR) Gram negative bacteria (GNB). *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 7: e0158740. doi: 10.1371/journal.pone.0158740
 9. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). 2012.
 10. Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T.T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 2, pp. 428–432. doi: 10.1128/AAC.45.2.428-432.2001
 11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 8.0. 2018.
 12. Guo W., Shan K., Xu B., Li J. Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathog. Glob. Health.*, 2015, vol. 109, no. 4, pp. 184–192. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000022
 13. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» — Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
 14. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 297–308. doi: 10.1586/eri.13.12
 15. Pitout J.D.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 10, pp. 5873–5884. doi: 10.1128/AAC.01019-15
 16. Reichel M., Schlicht A., Ostermeyer C., Kampf G. Efficacy of surface disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.*, 2014, vol. 28, no. 14: 292. doi: 10.1186/1471-2334-14-292
 17. Toth A., Damjanova I., Puskas E., Janvari L., Farkas M., Dobak A., Borocz K., Paszti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, vol. 29, no. 7, pp. 765–769. doi: 10.1007/s10096-010-0921-3
 18. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 9, pp. 2573–2582. doi: 10.1128/JCM.00888-17
 19. Zavascki A.P., Bulitta J.B., Landersdorfer C.B. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2013, vol. 11, no. 12, pp. 1333–1353. doi: 10.1586/14787210.2013.845523

Авторы:

Тапальский Д.В., к.м.н., доцент, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, г. Гомель, Беларусь;
Савченко О.И., врач-неонатолог 4-го детского отделения для недоношенных детей Гомельской областной клинической больницы, г. Гомель, Беларусь;
Бонда Н.А., врач-бактериолог микробиологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель, Беларусь.

Authors:

Tapalski D.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus;
Savchenko O.I., Neonatologist of the 4th Children's Department for Premature Children, Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Belarus;
Bonda N.A., Bacteriologist of the Microbiological Laboratory, Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus.

Поступила в редакцию 20.08.2018
 Отправлена на доработку 09.09.2019
 Принята к печати 13.09.2019

Received 20.08.2018
 Revision received 09.09.2019
 Accepted 13.09.2019