



Буткевич В.В.¹, Карпова Е.В.², Тапальский Д.В.^{1,3}✉, Колчанова Н.Э.², Петровская Т.А.², Залуцкая О.М.⁴, Зайцева В.Н.⁵, Филонюк В.А.¹, Жаворонок С.В.¹

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

³ Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁴ Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь

⁵ Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

Устойчивость к антибиотикам и их комбинациям карбапенемазопродуцирующих штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с COVID-19

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Буткевич В.В. – планирование и выполнение микробиологических исследований, написание текста; Карпова Е.В. – выполнение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, редактирование; Тапальский Д.В. – концепция и дизайн, анализ и интерпретация, редактирование статьи, критические замечания; Колчанова Н.Э. – выполнение микробиологических исследований; Петровская Т.А. – выполнение микробиологических исследований; Залуцкая О.М. – сбор материала; Зайцева В.Н. – сбор материала; Филонюк В.А. – редактирование; Жаворонок С.В. – обработка, редактирование.

Подана: 02.04.2024

Принята: 23.07.2024

Контакты: tapalskiy@yandex.by

Резюме

Цель. Оценить чувствительность к антибиотикам и их комбинациям продуцирующих карбапенемазы клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с бактериальными осложнениями COVID-19.

Материалы и методы. Для 70 клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов с бактериальными осложнениями COVID-19 в 2021–2022 гг., методом ПЦР в реальном времени выполнена детекция генов карбапенемаз. Методом микроразведений в бульоне определены минимальные подавляющие концентрации антибиотиков (амикацина, колистина, тигециклина, меропенема). Определение чувствительности к двойным и тройным комбинациям антибиотиков выполнено модифицированным методом тестирования бактерицидности различных комбинаций.

Результаты. Устойчивость к амикацину выявлена у 75,7% штаммов *K. pneumoniae* (МПК₅₀ и МПК₉₀ ≥ 1024 мг/л), к меропенему – у 91,4% (МПК₅₀ – 64 мг/л, МПК₉₀ – 256 мг/л), к колистину – у 90,0% (МПК₅₀ – 32 мг/л, МПК₉₀ ≥ 256 мг/л), к тигециклину – у 40,0% (МПК₅₀ – 0,5 мг/л, МПК₉₀ – 1 мг/л). Продуцентами карбапенемазы NDM являлись 4,3% штаммов, OXA-48 – 52,5%, копродуцентами NDM + OXA-48 – 35,7%, OXA-48 + KPC – 2,9%, NDM + OXA-48 + KPC – 4,3%. Среди протестированных комбинаций антибиотиков наиболее эффективной была тигециклин-колистин (бактерицидный эффект в отношении 52,9% штаммов, бактериостатический – 44,3% штаммов). Другие комбинации с включением колистина были активны в отношении 47,1–65,7% штаммов. Комбинации из двух карбапенемов не проявляли бактерицидной активности в отношении карбапенеморезистентных штаммов.



Заключение. Выявленные высокие уровни резистентности к эмпирически назначаемым антибиотикам и их комбинациям требуют более широкого внедрения в рутинную практическую деятельность микробиологических лабораторий методов определения значений минимальных подавляющих концентраций и выявления синергидной активности комбинаций из нескольких антибиотиков.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, COVID-19, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, карбапенемы, колистин, комбинации антибиотиков

Vasili V. Butkevich¹, Elena V. Karpova², Dmitry V. Tapalski^{1,3}✉, Natalia E. Kolchanova², Tatiana A. Petrovskaya², Oksana M. Zalutskaya⁴, Vera N. Zaitseva⁵, Vasili A. Filonyk¹, Sergey V. Zhavoronok¹

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

³ Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

⁴ Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Belarus

⁵ City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

Resistance to Antibiotics and their Combinations in Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from COVID-19 Patients

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Vasili V. Butkevich – planning and performing microbiological tests, text writing; Elena V. Karpova – performing microbiological and molecular-genetic tests, editing; Dmitry V. Tapalski – study concept and design, analysis and interpretation, editing, critical remarks; Natalia E. Kolchanova – performing microbiological tests; Tatiana A. Petrovskaya – performing microbiological tests; Oksana M. Zalutskaya – material collecting; Vera N. Zaitseva – material collecting; Vasili A. Filonyk – editing; Sergey V. Zhavoronok – processing, editing.

Submitted: 02.04.2024

Accepted: 23.07.2024

Contacts: tapalskiy@yandex.by

Abstract

Purpose. To assess susceptibility to antibiotics and their combinations of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated from patients with COVID-19 bacterial co-infections.

Materials and methods. Carbapenemase genes were detected by real-time PCR in 70 *K. pneumoniae* strains isolated from patients COVID-19 with bacterial co-infections in 2021–2022. The MICs for antibiotics (amikacin, colistin, tigecycline, meropenem) were determined using the broth microdilution method. Susceptibility to double and triple antibiotic combinations was assessed by modified multiple combination bactericidal testing.

Results. Resistance to amikacin was detected in 75.7% of *K. pneumoniae* strains (MIC₅₀ and MIC₉₀ ≥ 1024 mg/l), to meropenem in 91.4% (MIC₅₀ – 64 mg/l, MIC₉₀ – 256 mg/l), to colistin in 90.0% (MIC₅₀ – 32 mg/l, MIC₉₀ ≥ 256 mg/l), to tigecycline in 40.0% (MIC₅₀ – 0.5 mg/l, MIC₉₀ – 1 mg/l). Among the isolated strains, 4.3% were producers of NDM carbapenemase,

52.5% of OXA-48, 35.7% were co-producers of NDM + OXA-48, 2.9% of OXA-48 + KPC, and 4.3% of NDM + OXA-48 + KPC. The tigecycline-colistin combination was rated the most effective (bactericidal effect against 52.9% of strains, bacteriostatic effect in 44.3%). Other colistin-based combinations have shown bactericidal effect against 47.1–65.7% of strains. Combinations of two carbapenems weren't active against carbapenem-resistant strains.

Conclusion. High levels of resistance to empirically prescribed antibiotics and their combinations were revealed, requiring a wider introduction of MICs determination methods and the identification of synergistic activity of antibiotic combinations into the routine practice of microbiological laboratories.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, COVID-19, antibiotic resistance, carbapenemases, carbapenems, colistin, antibiotic combinations

■ ВВЕДЕНИЕ

Klebsiella pneumoniae является одним из наиболее значимых возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. По данным международных сетей по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам EARS-Net и CAESAR, уровень резистентности инвазивных штаммов *K. pneumoniae* к карбапенемам в Беларуси остается самым высоким среди европейских стран, а на фоне пандемии COVID-19 отмечен рост резистентности (с 75,9% в 2019 г. до 86,7% в 2021 г.) [1]. В выполненных в Беларуси локальных исследованиях отмечается связанный с пандемией COVID-19 рост резистентности *K. pneumoniae* как к отдельным антибиотикам (карбапенемам, аминогликозидам, колистину), так и к их комбинациям [2].

Устойчивость *K. pneumoniae* к карбапенемам обусловлена главным образом продукцией карбапенемаз различных типов (сериновых карбапенемаз OXA-48 и KPC, металло-бета-лактамазы NDM) и сочетается с устойчивостью к большинству β -лактамных и не- β -лактамных антибиотиков с формированием фенотипа множественной и экстремальной антибиотикорезистентности [3, 4].

Распространение экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* в госпитальной среде затрудняет проведение антибактериальной терапии и требует назначения комбинаций антибиотиков. В условиях сочетания различных генетических детерминант устойчивости у разных штаммов эффективность комбинаций антибиотиков является трудно предсказуемой, в силу чего появилась необходимость использования *in vitro* тестов для выбора оптимальной комбинированной терапии для конкретного пациента [5].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить чувствительность к антибиотикам и их комбинациям продуцирующих карбапенемазы клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с бактериальными осложнениями COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 70 штаммов *K. pneumoniae*, которые были выделены из крови (18 штаммов) и мокроты (52 штамма) пациентов с инфекцией COVID-19. Пациенты были госпитализированы в ГУ «Республиканский научно-практический центр



пульмонологии и фтизиатрии» и УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска в период 2021–2022 гг. В исследование включено не более 1 штамма от пациента. Первичная идентификация выполнялась с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция). Далее штаммы помещались в криоконсервант (бульон с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением 30% глицерина) и до выполнения основной части исследования хранились в низкотемпературном морозильнике при -80°C .

Детекцию генов металло- β -лактамаз NDM, генов сериновых карбапенемаз OXA-48 и KPC выполняли методом изотермической амплификации с использованием тест-системы «АмплиТест CP NDM/ OXA-48/ KPC LAMP Васто» («Амплисенс», РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) меропенема, амикацина, тигециклина и колистина определяли с помощью метода микроразведений в бульоне согласно ISO 20776-1:2019 [6]. Использовали катион-сбалансированный бульон Мюллера – Хинтона (Oxoid, United Kingdom), приготовленный в день проведения эксперимента, и чистые субстанции антибиотиков, полученные из коммерческих источников. Последовательные разведения антибиотиков вносили в 96-луночные круглодонные планшеты («Медполимер», РФ). Тестирование проводили в диапазоне концентраций 0,5–512 мг/л для меропенема и амикацина, 0,125–128 мг/л – для колистина, 0,03–32 мг/л – для тигециклина. Результаты интерпретировали в соответствии с критериями международного Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным лекарственным средствам (EUCAST) [7]. В качестве референс-штамма для контроля качества использовали *Escherichia coli* ATCC 25922 с известными значениями МПК.

Для определения чувствительности к 11 комбинациям из двух и трех антибиотиков использовали модифицированный метод МСВТ (Multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций). Исследование выполняли в 96-луночных круглодонных полистироловых планшетах. Использовали бульон Мюллера – Хинтона в объеме 100 мкл на лунку, антибиотики вносились в бульон в их фармакокинетических/фармакодинамических (ФК/ФД) концентрациях (меропенем – 8 мг/л, дорипенем – 2 мг/л, эртапенем – 1 мг/л, амикацин – 1 мг/л, левофлоксацин – 1 мг/л, тигециклин – 0,5 мг/л, колистин – 2 мг/л, кларитромицин – 1 мг/л, азитромицин – 1 мг/л).

После инкубации планшетов (24 ч. при 35°C) оценивали наличие видимого роста в лунках. Из каждой лунки делали высеивание 10 мкл на сектор плотной питательной среды (питательный агар, HiMedia, Индия) в чашках Петри. Инкубировали посевы 24 ч. при 35°C , оценивали наличие роста на секторах и делали заключение о наличии активности комбинаций. В случае отсутствия роста и в бульоне, и на плотной среде эффект комбинации считали бактерицидным. При отсутствии видимого роста в бульоне, но при наличии роста в высеве на плотной среде эффект комбинации учитывали как бактериостатический. При наличии роста и в бульоне, и на плотной среде микроорганизм считали устойчивым к комбинации антибиотиков.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продуцентами карбапенемазы NDM являлись 3 штамма (4,3%), OXA-48 – 37 (52,5%), копродуцентами NDM + OXA-48 – 25 (35,7%), OXA-48 + KPC – 2 (2,9%),

NDM + OXA-48 + KPC – 3 (4,3%). Копродукция одновременно нескольких карбапенемаз становится все более распространенным явлением среди экстремально-резистентных *K. pneumoniae*, однако одновременное присутствие трех карбапенемаз различных групп у одного штамма отмечено нами впервые [8, 9].

Все три штамма *K. pneumoniae*, копродуцирующих NDM + OXA-48 + KPC, были выделены в одном стационаре (Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии) за ограниченный промежуток времени (май – сентябрь 2022 г.). Два из них имели совпадающие фенотипы антибиотикорезистентности (устойчивость высокого уровня к меропенему, амикацину, колистину, чувствительность к тигециклину), что свидетельствует о возможном клональном происхождении. Выявление экстремально-антибиотикорезистентных штаммов с такими необычными фенотипами и генотипами устойчивости требует проведения расширенного микробиологического исследования в референсных лабораториях с привлечением молекулярных методов эпидемиологического маркирования и отслеживания дальнейшей их циркуляции в стационаре в рамках программ инфекционного контроля.

Распределение МПК антибиотиков представлено на рис. 1. Устойчивость к амикацину выявлена у 75,7% штаммов *K. pneumoniae* (МПК₅₀ и МПК₉₀ ≥ 1024 мг/л), к меропенему – у 91,4% (МПК₅₀ – 64 мг/л, МПК₉₀ – 256 мг/л), к колистину – у 90,0% (МПК₅₀ – 32 мг/л, МПК₉₀ ≥ 256 мг/л), к тигециклину – у 40,0% (МПК₅₀ – 0,5 мг/л, МПК₉₀ – 1 мг/л).

Известно, что наличие генов карбапенемаз может не проявляться фенотипически и несущие их штаммы могут сохранять чувствительность к карбапенемам. В настоящем исследовании среди 5 формально чувствительных к меропенему штаммов

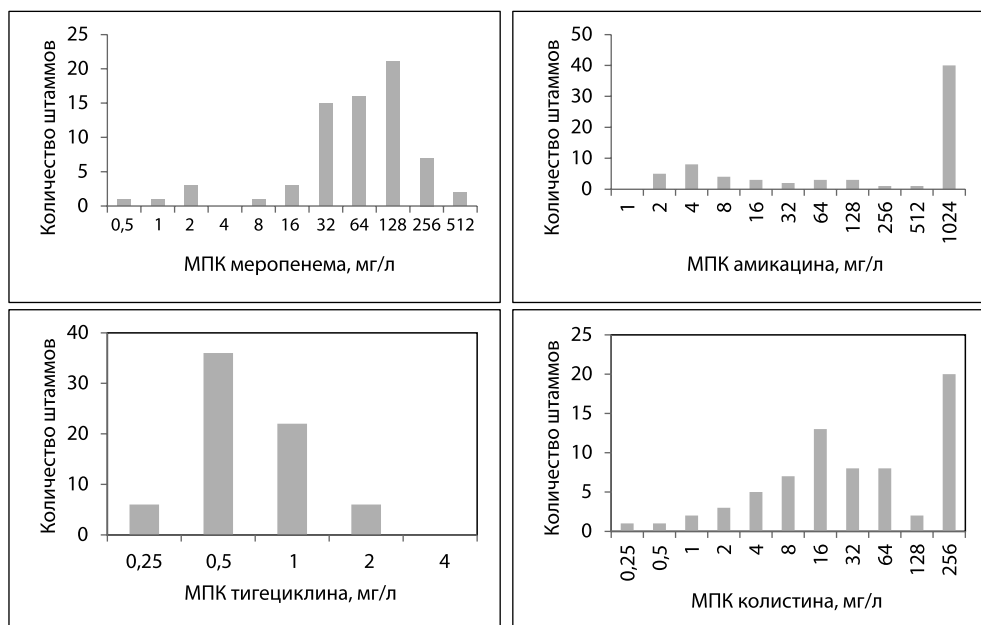


Рис. 1. Распределение МПК антибиотиков для штаммов *K. pneumoniae*

Fig. 1. Distribution of MIC antibiotics against *K. pneumoniae* strains



(МПК 0,5–2 мг/л) продуцентами карбапенемазы NDM являлись 2 штамма, OXA-48 – 1 штамм, копродуцентами NDM + OXA-48 – 2 штамма.

Вынужденное широкое применение полимиксинов как антибиотиков «последнего резерва» на фоне широко распространившейся экстремальной антибиотикорезистентности привело к возникновению и распространению устойчивости к ним. Только 7 из 70 включенных в исследование штаммов сохраняли чувствительность к колистину (МПК ≤ 2 мг/л). Настораживает преобладание штаммов с высокими уровнями резистентности к колистину (МПК колистина ≥ 32 мг/л у 54,3% штаммов). Ранее нами было показано, что накапливающаяся в бактериальных популяциях *K. pneumoniae* устойчивость к полимиксинам является мутационной, связана с инсерционной инактивацией и делециями гена *mgrB*, а также функционально значимыми заменами в гене сенсорной киназы *ptgB* [10]. Отсутствие значительных изменений кинетики микробного роста у резистентных штаммов позволило спрогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину, а также ее сохранение в микробных популяциях *K. pneumoniae* даже в случае ограничения использования этого антибиотика [11].

В проведенном в Москве в 2020 г. исследовании у пациентов с бактериемией на фоне COVID-19 штаммы *K. pneumoniae* были выделены из крови в 41,1% случаев. Устойчивость к меропенему выявлена у 85,6% штаммов, к амикацину – у 73,7%, к колистину – у 11,1% [12]. Меньшая распространенность устойчивости к колистину может быть связана с локальными особенностями использования этого антибиотика в различных стационарах.

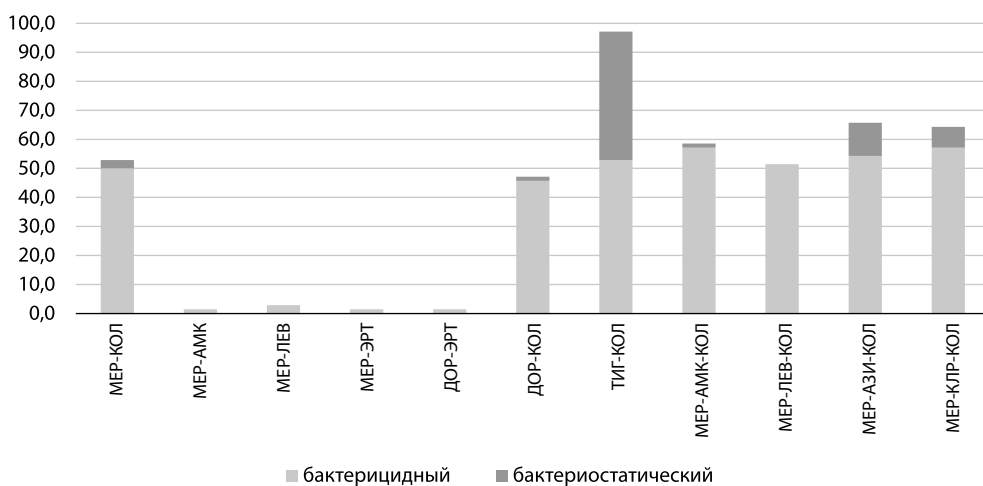


Рис. 2. Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к комбинациям антибиотиков

Примечания: МЕР – меропенем; КОЛ – колистин; АМК – амикацин; ЛЕВ – левофлоксацин; ЭРТ – эртапенем; ДОР – дорипенем; ТИГ – тигециклин; АЗИ – азитромицин; КЛР – кларитромицин.

Fig. 2. Susceptibility of *K. pneumoniae* strains to antibiotic combinations

Сформированная у *K. pneumoniae* устойчивость к карбапенемам и колистину часто не устранялась при сочетанном воздействии этих антибиотиков. Бактерицидный эффект комбинации меропенем и колистина отмечен только для 50,0% штаммов, бактерицидный эффект тройных комбинаций меропенем-амикацин-колистин и меропенем-левофлоксацин-колистин – соответственно для 57,1% и 51,4% штаммов (рис. 2). Среди протестированных комбинаций антибиотиков наиболее эффективной была комбинация тигециклин-колистин (бактерицидный эффект в отношении 52,9% штаммов, бактериостатический – 44,3% штаммов). Эффективность комбинаций из двух карбапенемов (меропенем-дорипенем, эртапенем-дорипенем) была низкой, бактерицидный эффект отмечался только для единичных штаммов.

Таким образом, комбинации полимиксинов с карбапенемами, в прошлом демонстрировавшие высокую микробиологическую эффективность в исследованиях *in vitro* в отношении экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий и хорошую клиническую эффективность при лечении вызываемых ими инфекций [13–15], в ситуации распространяющейся устойчивости высокого уровня к полимиксинам уже не могут рекомендоваться для эмпирического использования для преодоления устойчивости к карбапенемам.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от госпитализированных пациентов с инфекцией COVID-19, характеризовались присутствием генов карбапенемаз одного или нескольких типов (NDM + OXA-48, OXA-48 + KPC, NDM + OXA-48 + KPC), экстремальной устойчивостью к антибиотикам, включая устойчивость высокого уровня к колистину, а также устойчивостью к эмпирически назначаемым комбинациям антибиотиков.

Дальнейшее распространение экстремальной резистентности среди *K. pneumoniae* может значительно затруднить проведение этиотропной терапии и требует более широкого внедрения методов определения значений минимальных подавляющих концентраций антибиотиков и выявления синергидной активности комбинаций антибиотиков в рутинную практику микробиологических лабораторий.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2023 – 2021 data*. Stockholm: ECDC; 2023.
2. Tapalski D.V., Karpova E.V., Akulenok O.M., Okulich V.K., Generalov I.I. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the background of the COVID-19 pandemic: experience of the multidisciplinary hospital. *Infectious diseases: News, Opinions, Training*. 2021;10(3):15–22. doi: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-15-22. (in Russian)
3. Karampatakis T., Tsergouli K., Behzadi P. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):234. doi: 10.3390/antibiotics12020234
4. Karakonstantis S., Kritsotakis E.I., Gikas A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. *Infection*. 2020;48(6):835–851. doi: 10.1007/s15010-020-01520-6
5. Vardakas K.Z., Athanassaki F., Pitiriga V., Falagas M.E. Clinical relevance of *in vitro* synergistic activity of antibiotics for multidrug-resistant Gram-negative infections: A systematic review. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;17:250–259. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.004
6. ISO 20776-1:2019 *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases*. Available at: <https://www.iso.org/obp/ui> (accessed 30 Mar 2024).
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0*. Available at: https://eucast.org/clinical_breakpoints/
8. Lorenzin G., Gona F., Battaglia S. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;28:146–150. doi: 10.1016/j.jgar.2022.01.001



9. Genc S., Kolayli F., Ozelik E.Y. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first *K. pneumoniae* isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. *J Infect Chemother.* 2022;28(2):192–198. doi: 10.1016/j.jiac.2021.10.009
10. Petrovskaya T.A., Karpova E.V., Tapalski D.V. Molecular-genetic mechanisms of resistance of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains to polymyxins and antibiotics of other groups according to whole genome sequencing data. *Vestn Vitebsk State Med Univ.* 2021;20(5):34–41. doi: 10.22263/2312-4156.2021.5.34. (in Russian)
11. Tapalski D.V., Petrovskaya T.A., Kozlov A.E. Formation in vitro of colistin resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and its biological cost. *J Microbiol Epidemiol Immunobiol.* 2021;98(4):426–33. doi: 10.36233/0372-9311-101. (in Russian)
12. Malygin A.S., Andreev S.S., Tsarenko S.V. Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the blood of patients with COVID-19. *Medicina (Mex).* 2021;9(2):63–74. doi: 10.29234/2308-9113-2021-9-2-63-74. (in Russian)
13. Ardebili A., Izanloo A., Rastegar M. Polymyxin combination therapy for multidrug-resistant, extensively-drug resistant, and difficult-to-treat drug-resistant gram-negative infections: is it superior to polymyxin monotherapy? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2023;21(4):387–429. doi: 10.1080/14787210.2023.2184346
14. Ribeiro A.C.D.S., Chikhani Y.C., Valiatti T.B. In Vitro and In Vivo Synergism of Fosfomicin in Combination with Meropenem or Polymyxin B against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(2):237. doi: 10.3390/antibiotics12020237
15. Adaleti R., Nakipoglu Y., Calik S. Investigation of in vitro efficacy of meropenem/polymyxin B and meropenem/fosfomicin combinations against carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2023;70(2):155–160. doi: 10.1556/030.2023.02015