

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

## Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость

Тапальский Д.В.<sup>1✉</sup>, Петровская Т.А.<sup>1</sup>, Козлов А.Е.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь;<sup>2</sup>Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь

### Аннотация

**Введение.** Распространение устойчивости к карбапенемам среди грамотрицательных бактерий привело к росту потребления полимиксинов и появлению отдельных устойчивых к ним штаммов. Устойчивость к полимиксинам связана главным образом с мутациями в хромосомных генах. Развитие мутационной устойчивости к антибиотикам может приводить к снижению жизнеспособности бактерий, что проявляется увеличением продолжительности клеточного цикла, снижением вирулентности и конкурентоспособности.

**Цель исследования** — оценить *in vitro* интенсивность формирования устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, стабильность сформированной резистентности и её биологическую стоимость.

**Материалы и методы.** Для 46 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 77 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и 42 штаммов *Acinetobacter baumannii* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени выполнена детекция генов карбапенемаз, методом микроразведений в бульоне определены минимальные подавляющие концентрации меропенема и колистина. Выполнена селекция устойчивых субпопуляций на агаре Мюллер–Хинтон с добавлением 16 мг/л колистина. Для колистинорезистентных мутантов и изогенных чувствительных штаммов определены кинетические параметры роста в бульонной культуре. Инкубация и учёт результатов выполнены на микропланшетном ридере «Infinite M200» в течение 18,5 ч при 35°C с измерением светорассеяния в лунках каждые 15 мин.

**Результаты.** Выявлена продукция карбапенемаз МБЛ VIM у штаммов *P. aeruginosa*, МБЛ NDM, KPC и OXA-48 — у *K. pneumoniae*, OXA-23 и OXA-40 — у *A. baumannii*. Все штаммы были чувствительны к колистину (минимальная подавляющая концентрация 0,062–2 мг/л). Рост колоний на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, отмечен для 97,8% штаммов *K. pneumoniae*, 16,9% штаммов *P. aeruginosa* и 61,9% штаммов *A. baumannii*. Мутационная природа устойчивости к колистину подтверждена для 21,7% штаммов *K. pneumoniae*. Для колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* отмечено значимое увеличение продолжительности лаг-периода ( $T_{lag}$ ):  $225,6 \pm 7,037$  мин у исходных чувствительных штаммов и  $245,5 \pm 8,726$  у резистентных мутантов;  $p = 0,037$ . Показатели времени удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ( $T_{doubling}$ ) и площади под кривой бактериального роста не имели значимых отличий.

**Заключение.** Выявлена высокая частота формирования *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенемозопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*. Отсутствие значительных изменений кинетики микробного роста у резистентных штаммов позволяет прогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину, а также её сохранение в микробных популяциях *K. pneumoniae* даже в случае ограничения использования этого антибиотика.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, колистин, карбапенемы, карбапенемазы, мутации, резистентность, биологическая стоимость

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № ГР 20200311 «Изучение биологических и молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости к полимиксинам у экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий и обоснование комбинированной антибиотикотерапии вызываемых ими инфекций».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Тапальский Д.В., Петровская Т.А., Козлов А.Е. Формирование *in vitro* устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий и её биологическая стоимость. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):426–433.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

# Formation *in vitro* of colistin resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and its biological cost

Dmitry V. Tapalski<sup>✉</sup>, Tatiana A. Petrovskaya<sup>1</sup>, Aleksandr E. Kozlov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gomel State Medical University, Gomel, Belarus;

<sup>2</sup>Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

## Abstract

**Introduction.** The spread of resistance to carbapenems among gram-negative bacteria have led to an increase in the consumption of polymyxins and the emergence of certain strains resistant to them. Polymyxin resistance is mainly associated with mutations in chromosomal genes. The development of mutational resistance to antibiotics can lead to a decrease in the viability of bacteria, which is manifested by an increase in the duration of the cell cycle, a decrease in virulence and competitive fitness.

**The purpose** of the study was to assess *in vitro* the intensity of the formation of colistin resistance in carbapenem-resistant clinical isolates of gram-negative bacteria, the stability of the formed emerged resistance and its biological cost.

**Materials and methods.** For 46 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 42 strains of *Acinetobacter baumannii*, real time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the genes of carbapenemases, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of meropenem and colistin were determined by broth microdilution method. The selection of resistant subpopulations on Muller–Hinton agar with the addition of 16 mg/l colistin was carried out. For colistin-resistant mutants and their isogenic sensitive strains, the kinetic parameters of growth in broth culture were determined. Incubation and result recording were performed on an Infinite M200 microplate reader for 18.5 hours at 35°C with measurement of light scatter in the wells every 15 minutes.

**Results.** The production of carbapenemases MBL VIM in *P. aeruginosa*, MBL NDM, KPC and OXA-48 in *K. pneumoniae*, OXA-23 and OXA-40 in *A. baumannii* was observed. All strains were sensitive to colistin (MIC varied from 0.062 to 2 mg/l). The colony growth on a selective medium with 16 mg/l colistin was observed for 97.8% of *K. pneumoniae* strains, 16.9% of *P. aeruginosa* strains, and 61.9% of *A. baumannii* strains. The mutational nature of colistin resistance was confirmed for 21.7% of *K. pneumoniae* strains. For colistin-resistant mutants of *K. pneumoniae*, a significant increase in the duration of the lag phase ( $T_{lag}$ ) was observed:  $225.6 \pm 7.037$  min in the wild-type susceptible strains and  $245.5 \pm 8.726$  in resistant mutants,  $p = 0.037$ . The indicators of the doubling time of the number of microbial cells in the exponential growth phase ( $T_{doubling}$ ) and the area under the bacterial growth curve did not differ significantly.

**Conclusion.** A high frequency of formation of colistin resistance *in vitro* in carbapenemase-producing strains of *K. pneumoniae* was observed. The absence of significant changes in the kinetics of microbial growth in resistant strains makes it possible to predict the further spread of mutational resistance to colistin, as well as its preservation in microbial populations of *K. pneumoniae* even in the case of limiting the use of this antibiotic.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, colistin, carbapenems, carbapenemases, mutations, resistance, biological cost

**Funding source.** The work was carried out within the framework of the state assignment on the subject of research work No. SR 20200311 «Study of biological and molecular genetic mechanisms of formation of resistance to polymyxins in extensively drug-resistant Gram-negative bacteria and justification of combined antibiotic therapy of caused infections».

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** 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. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):426–433.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-101>

## Введение

Распространение множественной и экстремальной антибиотикорезистентности среди энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, связанное главным образом с продукцией карбапенемаз, привело к росту потребления полимиксинов, остающихся препаратами «последнего резерва» [1]. По данным международных сетей

по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам EARS-Net и CAESAR, уровень резистентности инвазивных изолятов *Klebsiella pneumoniae* к карбапенемам в 2018 г. в Беларуси был самым высоким среди европейских стран и составил 78% нечувствительных штаммов [2, 3]. В ряде исследований отмечено, что устойчивые к карбапенемам штаммы *K. pneumoniae* чаще имеют устойчи-

вость к полимиксинам по сравнению с чувствительными штаммами [1, 4]. В отчёте Европейской сети по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам (EARS-Net) за 2015 г. указано, что 29% устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* имели устойчивость к колистину, среди карбапенемочувствительных штаммов устойчивость к колистину отмечена только у 3% [5].

Устойчивость к полимиксинам связана с мутациями в хромосомных генах, проявляющихся изменениями структуры липополисахарида и ослаблением электростатического взаимодействия колистина с наружной мембраной микробной клетки [6, 7]. В 2016 г. описана плазмидно-опосредованная устойчивость к полимиксинам. Кодированная плазмидным геном *mcr-1* фосфоэтаноламинтрансфераза модифицирует липид А, изменяя его электрический заряд, что приводит к развитию устойчивости [8]. В настоящее время во многих регионах мира отмечается широкое распространение генов *mcr* среди бактерий [9].

Развитие мутационной устойчивости к антибиотикам часто приводит к снижению жизнеспособности бактерий, что проявляется увеличением продолжительности клеточного цикла, снижением вирулентности и конкурентоспособности [10]. Так, у *Acinetobacter baumannii* устойчивость к полимиксинам связана со значительными биологическими затратами, что снижает риск распространения устойчивых штаммов и объясняет, почему устойчивость к полимиксинам остаётся относительно редкой среди клинических изолятов этого вида [11, 12]. Имеющиеся сведения о биологической стоимости устойчивости к полимиксинам у *K. pneumoniae* немногочисленны и противоречивы. Присутствие *mcr-1*-несущей плазмиды приводило к значительному сокращению конкурентоспособности *K. pneumoniae* в отношении изогенного безплазмидного штамма в эксперименте *in vitro*, а также к снижению интенсивности размножения в модели инфекции бедра у мышей с индуцированной нейтропенией [13]. Напротив, наличие плазмид, кодирующих *mcr-1* и одновременно металло-бета-лактамазу NDM, не приводило к значительным изменениям кинетики микробного роста *Escherichia coli* и *K. pneumoniae* [14]. Лабораторные колистинорезистентные мутанты *K. pneumoniae* ST23 имели меньшую устойчивость к бактерицидному действию к нормальной человеческой сыворотке крови и меньшую вирулентность по сравнению с исходными чувствительными штаммами, а также значительно сниженную конкурентоспособность [15].

**Цель** исследования — оценить *in vitro* интенсивность формирования устойчивости к колистину у карбапенеморезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, стабильность сфор-

мированной резистентности и её биологическую стоимость.

## Материалы и методы

В исследование включены 165 устойчивых к карбапенемам штаммов грамотрицательных бактерий (46 штаммов *K. pneumoniae*, 77 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, 42 штамма *A. baumannii*), выделенных в 2015–2019 гг. в Беларуси в ходе многоцентровых проектов. Отобранные для исследования микроорганизмы были выделены в диагностически значимых количествах из мокроты, крови, мочи, раневого отделяемого госпитализированных пациентов в Гомеле (79 штаммов), районных центрах Гомельской области (Житковичи, Жлобин, Калинковичи, Лельчицы, Мозырь, Петриков, Речица, Рогачев, Светлогорск, Хойники — 37 штаммов), Могилёве (33 штамма), Минске (10 штаммов), Витебске (6 штаммов). До проведения исследования все штаммы хранились при  $-62^{\circ}\text{C}$  в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением 30% глицерина.

Детекция генов карбапенемаз была выполнена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора). Идентификация и определение чувствительности к антимикробным препаратам выполнены автоматизированным методом на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 Compact» («BioMerieux»).

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) меропенема и колистина дополнительно выполнено методом серийных микроразведений в бульоне Мюллер–Хинтон («BD») в стерильных круглодонных 96-луночных планшетах в соответствии с ISO 20776-1:2006 [16].

Для определения частоты возникновения устойчивости исследуемых штаммов к колистину использовался метод [17] с модификациями. Суточные культуры исследуемых штаммов, выращенные на плотной среде (питательный агар, «HiMedia»), смывали изотоническим раствором NaCl для получения бактериальных суспензий с оптической плотностью 16 МакФарланд (контроль денситометром), что соответствует  $5 \times 10^9$  микробных клеток/мл. В 90-мм полистироловые чашки Петри, содержащие 18–20 мл агара Мюллер–Хинтон с 16 мг/л колистина сульфата («Carl Roth»), вносили 100 мкл полученной суспензии. Используемая концентрация колистина в 8–256 раз превышала значения МПК колистина исследуемых штаммов. Чашки устанавливали на платформу спирального инокулятора, посев выполняли с использованием микробиологического прямого стерильного шпате-

ля, равномерно распределяя микробную суспензию по всей поверхности питательной среды при скорости вращения платформы 120–150 об/мин. Расчётная посевная доза составила  $5 \times 10^8$  микробных клеток на чашку.

Посевы инкубировали 24 ч при 35°C, чашки просматривали в отражённом и проходящем свете, при наличии роста проводили подсчёт колоний. Исследование для каждого штамма выполняли в 2 повторах. Частоту возникновения резистентности рассчитывали как соотношение количества выросших колоний к посевной дозе. Диапазон измерения частоты резистентности составлял от  $2 \times 10^{-9}$  (1 КОЕ на чашке) до  $10^{-6}$  (500 КОЕ на чашке и более).

Из отдельных колоний, выросших на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, накапливали чистые культуры. В дальнейшем выполняли их двукратное суточное субкультивирование на среде без антибиотика и криоконсервирование. Для исключения возможной контаминации во время исследований для полученных колистинорезистентных изолятов проводилась реидентификация с использованием диагностических систем «API 20E» и «API 20NE» («BioMerieux»).

Для дифференцировки мутационной устойчивости к колистину от гетерорезистентности для полученных резистентных штаммов выполняли исследование, аналогичное популяционному профилированию [18], используя модифицированную нами сокращённую методику. Из суточных культур полученных колистинорезистентных штаммов, выращенных на плотной неселективной среде, готовили суспензии в NaCl с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Полученные суспензии тщательно вортиксировали и последовательно разбавляли в 5000 раз стерильным NaCl. Расчётная концентрация микробных клеток составила  $3 \times 10^3$  на 1 мл. По 100 мкл полученной суспензии высевали с помощью шпателя и спирального инокулятора параллельно на чашку с агаром Мюллер–Хинтон и чашку с агаром Мюллер–Хинтон, содержащую 16 мг/л колистина сульфата. Расчётная посевная доза составила 300 микробных клеток на чашку. Посевы инкубировали 24 ч при 35°C, подсчитывали количество выросших колоний и сравнивали их количество на селективной и неселективной чашках. Исследование для каждого изолята выполняли в 2 повторах. При отсутствии роста на чашке с селективной средой либо при наличии на ней роста колоний в количестве менее 50% от количества колоний на неселективной чашке сформировавшуюся устойчивость рассматривали как вариант гетерорезистентности. Изоляты со сходным количеством колоний на селективной и неселективной среде либо отличающиеся по количеству не более чем на 50% считали мутантными, определяли для них МПК колистина

методом микроразведений в бульоне и отбирали для дальнейшего исследования.

Для оценки биологической стоимости устойчивости к колистину проводили сравнение кинетических характеристик роста в бульонной культуре для исходных колистиночувствительных штаммов (wild type, WT) и полученных из них колистинорезистентных мутантов ( $mut_{16}$ ). Из суточных культур микроорганизмов, выращенных на питательном агаре, готовили суспензии в NaCl с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Полученные суспензии смешивали с бульоном Мюллер–Хинтон в соотношении 1 : 1500, расчётная стартовая концентрация микроорганизмов в среде составляла  $10^5$  микробных клеток/мл. Тестирование проводили в объёме 100 мкл в 3 повторах для каждого штамма в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах с крышками («Sarstedt»). Инкубацию и учёт результатов выполняли на микропланшетном ридере «Infinite M200» («Tecan») в течение 18,5 ч при 35°C с измерением светорассеяния в лунках каждые 15 мин. Измерение светорассеяния выполняли на длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ). Для предупреждения возможных искажений, связанных с накоплением пузырьков газа в объёме среды, каждому циклу измерения предшествовали 30-секундное орбитальное перемешивание (амплитуда 3 мм, скорость 44 об/мин) и 30-секундное отстаивание. Данные регистрировали при помощи лицензионного программного обеспечения «Magellan 7.2» («Tecan»). Для анализа параметров бактериального роста значения  $OD_{600}$  пересчитывали в концентрационные единицы (КОЕ/мл) на основе предварительно построенной в диапазоне от 0 до  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл калибровочной кривой.

Рассчитывали продолжительность лаг-периода S-образной кривой ( $T_{lag}$ ), время удвоения количества микробных клеток в экспоненциальной фазе роста ( $T_{doubling}$ ), площадь под S-образной кривой бактериального роста (AUC). Аппроксимацию зависимости концентрации микробных клеток от  $OD_{600}$  и расчёт AUC выполняли в программе «GraphPad Prism 8.3» («GraphPad Com»). Параметры  $T_{lag}$  и  $T_{doubling}$  определяли с помощью программы «GrowthRates 4.3» (Bellingham Research Institute) в полулогарифмических координатах (lnКОЕ/мл). Качество аппроксимаций оценивали на основе значений квадрата коэффициента детерминации ( $R^2$ ), которое во всех случаях составляло  $\geq 0,99$ . Для оценки значимости различий параметров бактериального роста штаммов *K. pneumoniae* WT и  $mut_{16}$  с использованием программы «GraphPad Prism 8.3» рассчитывали ранговый T-критерий Вилкоксона и соответствующий ему уровень значимости *p*.

## Результаты

Включённые в исследование штаммы обладали устойчивостью к большинству антимикробных

препаратов и сохраняли чувствительность к коли-стину. Все штаммы *K. pneumoniae* являлись продуцентами карбапенемаз: КРС — 6 штаммов (13,0%), ОХА-48 — 26 штаммов (56,5%), NDM — 14 штаммов (30,4%). Все включённые в исследование штаммы *A. baumannii* продуцировали карбапенемазы группы ОХА: ОХА-23 — 2 штамма (4,8%), ОХА-40 — 39 штаммов (92,9%), ко-продукция ОХА-23 и ОХА-40 — 1 штамм (2,4%). Продукция металло-бета-лактамазы VIM выявлена у 7 из 77 штаммов *P. aeruginosa* (9,1%), у остальных штаммов устойчивость к карбапенемам не была связана с продукцией карбапенемаз.

МПК колистина, определённые методом микроразведений в бульоне, составили:

- для *K. pneumoniae* — 0,062–1,0 мг/л (МПК<sub>50</sub> — 1 мг/л, МПК<sub>90</sub> — 1 мг/л);
- для *P. aeruginosa* — 0,125–2,0 мг/л (МПК<sub>50</sub> — 0,5 мг/л, МПК<sub>90</sub> — 1 мг/л);
- для *A. baumannii* — 0,25–1,0 мг/л (МПК<sub>50</sub> — 0,5 мг/л, МПК<sub>90</sub> — 1 мг/л).

Для всех штаммов подтверждена устойчивость к меропенему, МПК меропенема находилась в диапазоне 16–1024 мг/л.

Рост колоний на селективной среде, содержащей 16 мг/л колистина, был отмечен для 97,8% штаммов *K. pneumoniae*, 16,9% штаммов *P. aeruginosa* и 61,9% штаммов *A. baumannii*. Значения частоты резистентности составили для *K. pneumoniae* от  $6 \times 10^{-9}$  до  $10^{-6}$  (медиана  $3 \times 10^{-7}$ ), для *P. aeruginosa* —  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  (медиана  $2 \times 10^{-7}$ ), для *A. baumannii* от  $4 \times 10^{-9}$  до  $10^{-6}$  (медиана  $8 \times 10^{-8}$ ). После выполнения популяционного профилирования мутационная природа устойчивости к коли-стину подтверждена только для 10 (21,7%) штаммов *K. pneumoniae*, 2 (2,6%) штаммов *P. aeruginosa*, 2 (4,8%) штаммов *A. baumannii*, остальные случаи возникновения устойчивых субпопуляций были интерпретированы как проявление гетерорезистентности.

У большинства колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* достигнутые значения МПК колистина значительно превышали концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась селекция мутаций (табл. 1). Так, 7 из 10 мутантных штаммов имели МПК колистина  $\geq 512$  мг/л, что в

**Таблица 1.** Частота возникновения мутационной устойчивости к колистину у *K. pneumoniae* и МПК колистина изогенных чувствительных штаммов и колистинорезистентных мутантов

**Table 1.** Frequency of occurrence of mutational resistance to colistin in *K. pneumoniae* and MIC of colistin isogenic sensitive strains and colistin-resistant mutants

Штамм Strain	Частота возникновения мутационной устойчивости Mutation frequencies	МПК колистина, мг/л MIC of colistin, mg/l	
		WT	mut <sub>16</sub>
ВК-039	$5 \times 10^{-7}$	1	128
ВК-080	$3 \times 10^{-7}$	1	$\geq 512$
ВК-104	$2 \times 10^{-7}$	1	$\geq 512$
ВК-111	$10^{-6}$	1	$\geq 512$
ВК-114	$3 \times 10^{-7}$	0,5	64
ВК-117	$6 \times 10^{-8}$	1	$\geq 512$
ВК-123	$2 \times 10^{-7}$	0,5	$\geq 512$
ВК-148	$6 \times 10^{-8}$	1	32
ВК-153	$4 \times 10^{-7}$	1	$\geq 512$
V-377	$3 \times 10^{-7}$	0,5	$\geq 512$

512 и более раз превышало МПК колистина изогенных чувствительных штаммов.

Для колистинорезистентных мутантов *K. pneumoniae* отмечено значимое увеличение  $T_{lag}$ . Показатели  $T_{doubling}$  и AUC не имели значимых отличий (табл. 2; рисунок). Для 8 из 10 штаммов *K. pneumoniae* mut<sub>16</sub> отмечалось сокращение  $T_{doubling}$ , связанное с увеличением скорости размножения в экспоненциальной стадии роста в сравнении с изогенными WT-штаммами.

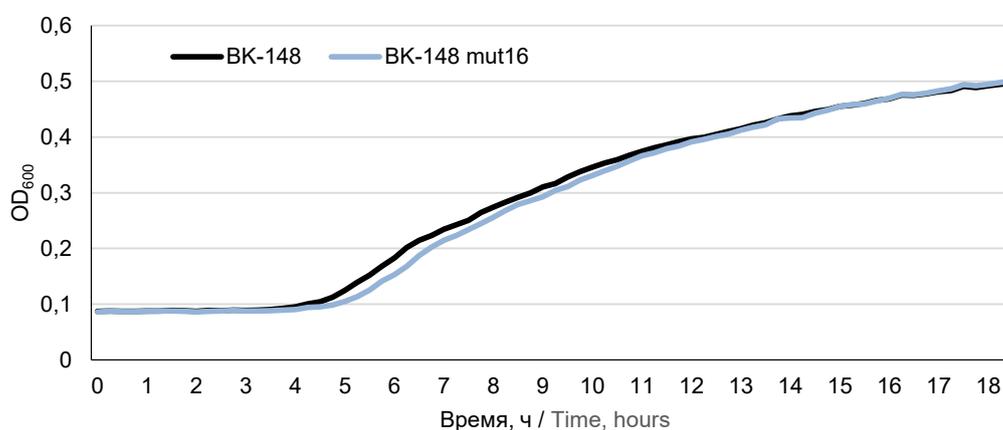
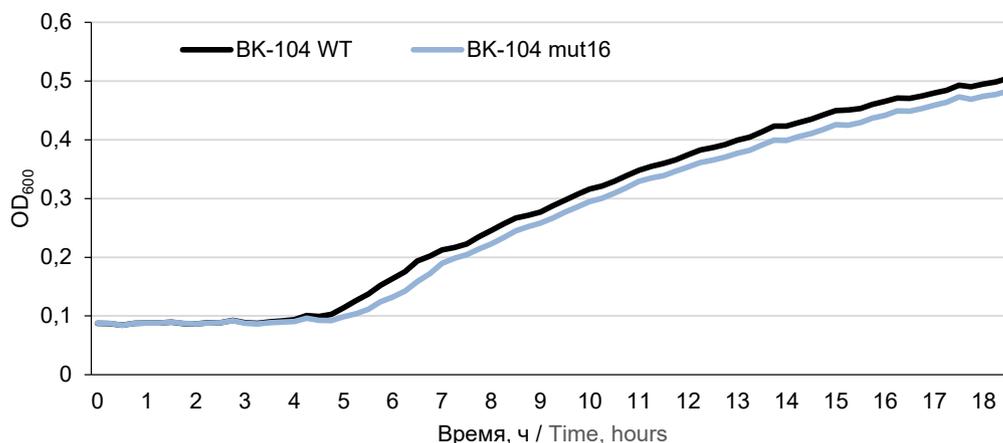
## Обсуждение

Широкое распространение устойчивости к карбапенемам среди грамотрицательных бактерий ведёт к увеличению потребления полимиксинов в качестве препаратов «последнего резерва». Формирование отдельных колистинорезистентных субпопуляций в присутствии антибиотика и вытеснение ими чувствительных микроорганизмов способству-

**Таблица 2.** Параметры бактериального роста колистиночувствительных штаммов *K. pneumoniae* и колистинорезистентных мутантов

**Table 2.** Parameters of bacterial growth of colistin-sensitive *K. pneumoniae* strains and colistin-resistant mutants

Группа штаммов Group of strains	$T_{lag}$ , мин $T_{lag}$ , min	$T_{doubling}$ , мин $T_{doubling}$ , min	AUC
WT	225,6 ± 7,037	32,24 ± 0,5462	20444 ± 1159
mut <sub>16</sub>	245,5 ± 8,726	30,89 ± 0,7555	19361 ± 676,9
$P_{(WT-mut16)}$	0,037	0,065	0,770



Кинетика роста штаммов *K. pneumoniae* BK-104, BK-148 и изогенных колистинорезистентных мутантов.  
Growth kinetics of *K. pneumoniae* strains BK-104, BK-148 and isogenic colistin-resistant mutants.

ет увеличению устойчивости к колистину. Сдерживающим фактором распространения устойчивости может стать её биологическая стоимость, проявляющаяся снижением интенсивности размножения, вирулентности и конкурентоспособности колистинорезистентных мутантов.

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами исследований, анализирующих частоту гетерорезистентности и мутационной резистентности к колистину среди карбапенеморезистентных грамотрицательных бактерий. В исследовании G. Meletis и соавт. наличие гетерорезистентности к колистину отмечено для 12 (75%) из 16 колистиночувствительных штаммов *K. pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз КРС и VIM-1, частота возникновения резистентности составляла от  $3,2 \times 10^{-7}$  до  $3,5 \times 10^{-5}$  [19]. В исследовании A. Cannatelli и соавт. отмечено формирование мутационной устойчивости к колистину для продуцирующих карбапенемазы КРС-3 и OXA-48 штаммов *K. pneumoniae* с частотой от  $4,7 \times 10^{-8}$  до  $7,0 \times 10^{-7}$  [20]. В работе D.M. Hermes и соавт. гете-

рорезистентность к колистину выявлена только для 1 (8,3%) из 12 включённых в исследование карбапенеморезистентных штаммов *P. aeruginosa* [21]. Гетерорезистентность к колистину отмечена для 9 (20,5%) из 44 колистиночувствительных изолятов *A. baumannii*, продуцирующих карбапенемазы группы OXA. Её частота составила от  $4,4 \times 10^{-6}$  до  $6 \times 10^{-4}$  [22].

В настоящем исследовании способность к формированию колистинорезистентных субпопуляций проявлялась главным образом среди карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* и в меньшей степени — среди *A. baumannii*. При этом по результатам популяционного профилирования мутационный характер устойчивости к колистину отмечен для 21,5% штаммов *K. pneumoniae* и только 4,8% штаммов *A. baumannii*. Достигнутые значения МПК колистина резистентных мутантов *K. pneumoniae* значительно превышали концентрацию антибиотика в среде, на которой выполнялась их селекция. Биологическая стоимость резистентности проявлялась только увеличением продол-

жительности лаг-периода. В целом интенсивность размножения исходных штаммов и изогенных колистинорезистентных мутантов была сопоставимой, что позволяет сделать заключение об отсутствии влияния развившейся устойчивости на конкурентоспособность.

Похожие данные получены в работе А. Спанателли и соавт. Сформированная *in vitro* в присутствии 16 мкг/л колистина мутационная устойчивость у карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* была связана с инактивацией регуляторного гена *mgrB*. Она развивалась у штаммов из различных клональных групп (ST16, ST258, ST512). При совместном культивировании изогенных штаммов не выявлено снижения конкурентоспособности у колистинорезистентных мутантов и сделано заключение об отсутствии значимой биологической стоимости мутационной устойчивости к колистину [21].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой частоте формирования мутационной устойчивости к колистину у выделенных в Беларуси карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, а также об отсутствии значительных изменений кинетики микробного роста у резистентных штаммов. Это в целом согласуется с результатами подобных исследований, выполненных в других странах. Можно прогнозировать дальнейшее распространение мутационной резистентности к колистину и её сохранение в микробных популяциях *K. pneumoniae* даже в случае значительного сокращения потребления антибиотика.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Li Z., Cao Y., Yi L., Liu J.H., Yang Q. Emergent polymyxin resistance: end of an era? *Open Forum Infect. Dis.* 2019; 6(10): ofz368. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz368>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2019. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2019.
- Stefaniuk E.M., Tyski S. Colistin resistance in *Enterobacteriales* strains – a current view. *Pol. J. Microbiol.* 2019; 68(4): 417–27. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.
- Meletis G., Skoura L. Polymyxin resistance mechanisms: from intrinsic resistance to *Mcr* genes. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2018; 13(3): 198–206. <https://doi.org/10.2174/1574891X14666181126142704>
- Aghapour Z., Gholizadeh P., Ganbarov K., Bialvaei A.Z., Mahmood S.S., Tanomand A., et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 965–75. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199844>
- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(2): 161–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Poirel L., Jayol A., Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017; 30(2): 557–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Melnyk A.H., Wong A., Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 2015; 8(3): 273–83. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>
- Beceiro A., Moreno A., Fernandez N., Vallejo J.A., Aranda J., Adler B., et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(1): 518–26. <https://doi.org/10.1128/AAC.01597-13>
- Lopez-Rojas R., McConnell M.J., Jimenez-Mejias M.E., Dominguez-Herrera J., Fernandez-Cuenca F., Pachon J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(9): 4587–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-13>
- Nang S.C., Morris F.C., McDonald M.J., Han M.L., Wang J., Strugnell R.A., et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018; 73(6): 1604–10. <https://doi.org/10.1093/jac/dky061>
- Wang R., Liu Y., Zhang Q., Jin L., Wang Q., Zhang Y., et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla* NDM with low fitness cost. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018; 51(5): 739–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.023>
- Choi M.J., Ko K.S. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(11): 6763–73. <https://doi.org/10.1128/AAC.00952-15>
- 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; 2006. Available at: <https://www.iso.org/standard/41630.html>
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000; 288(5469): 1251–4. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Sherman E.X., Wozniak J.E., Weiss D.S. Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1946: 39–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_4)
- Meletis G., Tzampaz E., Sianou E., Tzavaras I., Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66(4): 946–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr007>
- Cannatelli A., Santos-Lopez A., Giani T., Gonzalez-Zorn B., Rossolini G.M. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(5): 2898–900. <https://doi.org/10.1128/AAC.04998-14>
- Hermes D.M., Pormann P.C., Lutz L., Teixeira A.B., Ribeiro V.B., Netto B., et al. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62: 1184–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059220-0>
- Ezadi F., Jamali A., Heidari A., Javid N., Ardebili A. Heteroresistance to colistin in oxacillinase-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Gorgan, Northern Iran. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 21: 380–5. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.010>

### Информация об авторах

**Талальский Дмитрий Викторович**  — д.м.н., доцент, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь, [tapalskiy@gsmu.by](mailto:tapalskiy@gsmu.by), <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>

**Петровская Татьяна Александровна** — ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь, <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>

**Козлов Александр Евгеньевич** — н.с. Научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Беларусь; н.с. лаб. эндокринологии и биохимии Института радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-3220-250X>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 19.11.2020;  
принята к публикации 10.02.2021;  
опубликована 10.07.2021

### Information about the authors

**Dmitry V. Tapalski**  — D. Sci. (Med.), Head, Department of microbiology, virology and immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, [tapalskiy@gsmu.by](mailto:tapalskiy@gsmu.by), <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>

**Tatiana A. Petrovskaya** — assistant, Department of microbiology, virology and immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>

**Aleksandr E. Kozlov** — researcher, Research Laboratory, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus; researcher, Laboratory of biochemistry and endocrinology, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-3220-250X>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 19.11.2020;  
accepted for publication 10.02.2021;  
published 10.07.2021