

Прогнозирование эффективности азтреонама в отношении *Klebsiella pneumoniae* по результатам оценки чувствительности бактерии к антибиотику при увеличенном инокуляте

*К. Н. АЛИЕВА, М. В. ГОЛИКОВА, Д. А. КОНДРАТЬЕВА, А. А. КУЗНЕЦОВА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва, Россия

Резюме

Актуальность. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) антибиотика не позволяет прогнозировать риск развития устойчивости бактерий под воздействием антибиотика из-за малой выборки бактерий. Минимальная подавляющая концентрация антибиотика при увеличенном инокуляте (МПК_{ВИ}) может стать подходящим для такой цели параметром за счёт увеличенной выборки и простоты определения. **Цель.** Исследование направлено на оценку потенциала использования МПК_{ВИ} как параметра для прогнозирования развития устойчивости *Klebsiella pneumoniae* к азтреонаму. **Методы.** Оценили значения МПК и МПК_{ВИ} азтреонама в отношении двух штаммов *K. pneumoniae* методом микроразведений (объём 0,2 мл; инокулят 5×10^5 и 5×10^7 КОЕ/мл, соответственно) и сопоставили результаты с эффектом азтреонама в динамической системе *in vitro*, где моделировали режим применения азтреонама 2 г каждые 8 ч в виде 2-часовой инфузии в течение 5 сут. **Результаты.** Эффективность азтреонама в отношении *K. pneumoniae*, наблюдаемая в динамической системе, согласовывалась со значениями МПК_{ВИ} после уточнения результатов по оценке жизнеспособности бактерий. При визуальной оценке значения МПК_{ВИ} были сильно завышены из-за избыточной мутности вследствие образования filamentous форм бактерий под действием азтреонама. **Заключение.** Параметр МПК_{ВИ} можно использовать для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму при оценке значений данного параметра по численности жизнеспособных клеток, но не по визуальной границе роста.

Ключевые слова: азтреонам; *K. pneumoniae*; динамическая система *in vitro*; оценка чувствительности бактерий к антибиотикам

Для цитирования: Алиева К. Н., Голикова М. В., Кондратьева Д. А., Кузнецова А. А. Прогнозирование эффективности азтреонама в отношении *Klebsiella pneumoniae* по результатам оценки чувствительности бактерии к антибиотику при увеличенном инокуляте. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 42–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-42-50>. EDN: FSGBXG.

Prediction of Aztreonam Effectiveness Against *Klebsiella pneumoniae* Based on the Results of Antimicrobial Susceptibility Testing with Increased Inoculum

*KAMILLA N. ALIEVA, MARIA V. GOLIKOVA,
DARIA A. KONDRATIEVA, ANASTASIYA A. KUZNETSOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Abstract

Background. The minimum inhibitory concentration (MIC) does not predict the risk of antibacterial resistance development due to a small sample of tested bacteria. Minimum inhibitory concentration at an increased inoculum (MIC_{HI}) may become a suitable parameter for this purpose as a sample of tested bacteria is larger while the method of determination remains easy. **The aim of the study** was to evaluate the potential of using MIC_{HI} as a parameter for predicting the resistance development in *Klebsiella pneumoniae* to aztreonam. **Methods.** Aztreonam MIC and MIC_{HI} values were assessed against two strains of *K. pneumoniae* using the microdilution method (0.2 ml volume; inoculum of 5×10^5 and 5×10^7 CFU/ml, respectively) and compared the results with the effect of aztreonam in a dynamic *in vitro* model, in which aztreonam regimen of 2 grams every 8 hours as a 2-hour infusion for 5 days was simulated. **Results.** The efficacy of aztreonam against *K. pneumoniae* observed in the dynamic model was consistent with the MIC_{HI} values assessed based on bacterial viability. During the visual assessment, the MIC_{HI} values were greatly overestimated due to excessive turbidity caused by the formation of filamentous forms of bacteria exposed to aztreonam. **Conclusions.** The MIC_{HI} parameter can be used to predict the devel-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: qvimqwem@yandex.ru



*Correspondence to:
E-mail: qvimqwem@yandex.ru



opment of resistance in *K. pneumoniae* to aztreonam when assessing the values of this parameter by the number of viable cells, but not by the visual boundary of bacterial growth.

Keywords: aztreonam; *K. pneumoniae*; *in vitro* dynamic model; antimicrobial susceptibility testing

For citation: Alieva K. N., Golikova M. V., Kondratieva D. A., Kuznetsova A. A. Prediction of aztreonam effectiveness against *Klebsiella pneumoniae* based on the results of antimicrobial susceptibility testing with increased inoculum. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3–4): 42–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-42-50>. EDN: FSGBXG.

Введение

Минимальная подавляющая концентрация антибиотика (МПК) — это стандартный параметр, применяемый для оценки чувствительности бактерий к антибиотику [1] и подбора препарата для лечения пациента с инфекционным заболеванием. В свете проблемы распространения бактериальной резистентности к антибиотикам надёжность данного параметра можно считать недостаточной: значение МПК не позволяет прогнозировать риск развития устойчивости бактерий под воздействием антибиотика. Выборка бактерий при широко применяемом методе микроразведений (инокулят 5×10^5 КОЕ/мл; объём суспензии 0,2 мл) составляет 10^5 КОЕ. При частоте мутаций 10^{-6} и реже [2–4] маловероятно попадание устойчивых клеток в такую выборку. В то же время, популяция бактерий в очаге инфекции у человека может быть достаточно концентрированной, что обуславливает высокую вероятность присутствия устойчивых субпопуляций [5–7].

Подходящим для прогнозирования риска развития устойчивости бактерий может быть параметр, при определении которого используется высокая концентрация бактерий, то есть большая выборка. Минимальная концентрация, предотвращающая рост мутантов, устойчивых к антибиотику (МПК_М) — параметр такого типа, определяемый при инокуляте $\sim 10^{10}$ КОЕ/мл. Согласно результатам ряда работ, МПК_М можно использовать для прогнозирования развития резистентности бактерий [8–10]. Однако методика определения данного параметра весьма трудоёмка [11] и не подходит для клинической практики.

Минимальная подавляющая концентрация антибиотика при увеличенном инокуляте (МПК_{ВИ}) — альтернативный МПК_М параметр, который может стать подходящим вариантом для внедрения в клиническую практику благодаря методике определения, близкой к таковой для МПК: изменение состоит лишь в увеличении бактериального инокулята до 5×10^7 КОЕ/мл. При оценке МПК_{ВИ} часто наблюдали снижение чувствительности бактерий к антибиотику по сравнению с результатами оценки МПК [12]. Такой сдвиг наиболее характерен для бета-лактамов антибиотиков и продуцентов бета-лактамаз. Снижение чувствительности в 8 и более раз называют «инокулюм эффект» (inoculum effect).

Можно предположить, что снижение чувствительности бактерий при определении МПК_{ВИ} —

это следствие присутствия в популяции устойчивых к антибиотику клеток. Согласно результатам недавнего исследования, значения МПК_{ВИ} меропенема в отношении *Klebsiella pneumoniae* схожи со значениями МПК_М [13]. Обнаруженная корреляция даёт основания полагать, что параметр МПК_{ВИ} может быть использован для прогнозирования развития устойчивости бактерий к антибиотикам.

Чтобы оценить потенциал использования МПК_{ВИ} как параметра для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму, мы оценили значения МПК_{ВИ} данного антибиотика в отношении двух штаммов и сопоставили результаты с эффектом азтреонама в динамической системе *in vitro*, где моделировали клинический режим применения антибиотика. Помимо МПК_{ВИ} определяли МПК_М для сравнения прогностической ценности этих параметров.

Материал и методы

Антибиотики и бактериальные штаммы. Азтреонам был приобретён в Clearsynth (Andheri West, Mumbai).

Объектами исследования были клинические изоляты *K. pneumoniae* 74 и 189, продуцирующие NDM-карбапенемазы.

Оценка значений МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М. Значения МПК азтреонама в отношении исследуемых штаммов *K. pneumoniae* определяли методом микроразведений в 0,2 мл бульона Мюллера–Хинтона (МХБ) при плотности инокулята 5×10^5 КОЕ/мл [1]. Значения МПК_{ВИ} определяли в аналогичных условиях, но при плотности инокулята 5×10^7 КОЕ/мл. У выделенных из динамической системы бактерий повторно определяли значения МПК и МПК_{ВИ}. Как для МПК, так и для МПК_{ВИ} концентрацию антибиотика, подавляющую рост бактерий, определяли по отсутствию видимого роста бактерий (осадок или мутность). Штаммы характеризовали согласно пороговым значениям подавляющих концентраций EUCAST 2023 г.: ≤ 1 мкг/мл — чувствительный, >4 мкг/мл — устойчивый [14].

Помимо определения значений МПК и МПК_{ВИ} азтреонама путём визуальной оценки прозрачности/мутности лунок, значения параметров оценивали посредством определения концентрации жизнеспособных клеток, находившихся под воздействием антибиотика в лунках планшета в течение 24 ч при 37°C, и сравнения её с исходной концентрацией (5×10^5 КОЕ/мл или 5×10^7 КОЕ/мл). Значение МПК определяли как значение концентрации, при которой численность клеток была равна или ниже исходной численности, то есть рост клеток был подавлен или происходила их гибель. Для этого проводили высевы проб из всех лунок планшета на агар Мюллера–Хинтона II (МХА). После инкубирования чашек с агаром в течение 24 ч при 37°C оценивали численность бактерий и значения МПК и МПК_{ВИ} азтреонама.

Значения МПК_М азтреонама определяли по ранее описанной схеме [13]. Тестируемый микроорганизм культивировали в МХБ в течение 18–24 ч при 37°C. Затем бактериальную суспензию концентрировали методом центрифугирования

(3600×g, 20 мин) до ~10¹⁰ КОЕ/мл. Делали посевы на МХА с азтреоном в концентрации 0,125–256 мкг/мл, инкубировали в течение 24–48 ч при 37°C и подсчитывали число колоний. В случаях неоднозначного роста, например, при образовании полупрозрачного налёта на агаре вместо чётких колоний, с агара отбирали пробу петлёй и пересевали штрихом на агар с такой же концентрацией антибиотика, после чего агар со штрихом инкубировали и окончательно оценивали наличие или отсутствие роста микроорганизма. За МПК_М принимали наименьшую концентрацию меропенема, при которой рост бактерий полностью подавлялся.

Определение МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М проводили не менее, чем в двух повторностях.

Фармакодинамические эксперименты в динамической системе *in vitro*. Эксперименты проводили в динамической системе *in vitro* диализного типа [15] по подробно описанной методике [16]. В качестве биореактора, моделирующего очаг инфекции, использовали картридж с целлюлозными волокнами Fiber-Cell C3001 (Fiber-Cell Systems, USA), проницаемыми для молекул антибиотика, но не бактериальных клеток. Картридж находился в термостате при 37°C, его заполняли стерильным МХБ и вводили 18-часовую культуру *K. pneumoniae* для достижения инокулята 10⁸ КОЕ/мл. Спустя 2 ч отбирали биопробы для оценки действительной стартовой численности бактерий, после чего начинали введение антибиотика.

Моделировали пятидневное лечение азтреоном при режиме дозирования 2 г каждые 8 ч в виде 2-часовой инфузии (всего 15 инфузий); моноэкспоненциальный профиль в эпителиальной жидкости лёгких с периодом полувыведения 2 ч [17–18]. Проникновение азтреонама в эпителиальную жидкость лёгких принимали за 50% [19–21]. Значения фармакокинетических параметров были следующими: максимальная концентрация азтреонама — 31,5 мкг/мл, минимальная концентрация азтреонама — 3,95 мкг/мл, площадь под кривой концентрация антибиотика–время — 354 (мкг×ч)/мл. Для моделирования периодической инфузии антибиотика в биореактор, непрерывной элиминации антибиотика из системы с постоянной скоростью, а также постоянного перемешивания содержимого биореактора использовали перистальтические насосы Cole-Parmer Masterflex L/S (Cole-Parmer, USA).

На протяжении пятидневных экспериментов из системы отбирали биопробы для определения численности бактерий культуральным методом (посев проб на МХА), а также для оценки мутности отобранных бактериальных суспензий с помощью денситометра Densilameter II (Erba Lachema s.r.o., Brno, Czech Republic). При посеве проб на МХА, а также на МХА с азтреоном в концентрации 2×, 4×, 8× и 16×МПК, образцы разводили при необходимости. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч и подсчитывали выросшие колонии. Предел количественного определения составлял 3,3 и 1 log КОЕ/мл для общей популяции и устойчивых субпопуляций бактерий, соответственно.

Флуоресцентная микроскопия. Чтобы изучить морфологию клеток *K. pneumoniae*, подвергнутых воздействию азтреонама, проводили флуоресцентную микроскопию с акридиновым оранжевым [22]. В бактериальную суспензию объёмом 200 мл с инокулятом 5×10⁵ КОЕ/мл добавляли азтреонам до концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Пробы объёмом 50 мл отбирали на 0, 2, 8 и

24 часу инкубации, концентрировали методом центрифугирования (3600×g, 20 мин). Из осадка отбирали пробу объёмом 25 мкл, которую помещали на предметное стекло, высушивали в асептических условиях и окрашивали, ресуспендируя в 5 мкл 0,01% раствора акридинового оранжевого (раствор в ацетатном буфере, pH=4) и накрывали покровным стеклом. Также из осадка отбирали пробу для высева на агар, чтобы оценить жизнеспособность клеток.

Иммерсионную флуоресцентную микроскопию проводили с использованием микроскопа Leica DM IL Led. (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany), оснащённого фильтром I3 для «голубого возбуждения» (фильтр BP 450–490 нм; зеркало 510; фильтр LP515(S)) при 1000-кратном увеличении. Клетки, окрашенные акридиновым оранжевым, имели зелёную, жёлтую, оранжевую или красную флуоресценцию на зелёном фоне. Окрашенные клетки подсчитывали в 5 полях зрения, вычисляли среднее количество и пересчитывали его на численность клеток (log КОЕ/мл).

Результаты

Значения МПК азтреонама в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189 составили 1 и 0,25 мкг/мл, соответственно, что характеризовало оба штамма как чувствительные к антибиотику (таблица). Значения МПК_{ВИ} для данных объектов превышали 256 мкг/мл, что меняло характеристику штаммов на резистентные к азтреоному. Значения МПК_М азтреонама составили 2 и 0,5 мкг/мл в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189, соответственно.

Результаты экспериментов в динамической системе *in vitro* представлены на рис. 1. В случае обоих штаммов наблюдали резкое снижение численности клеток в первые сутки моделируемой терапии, после которого отмечали вторичный рост у *K. pneumoniae* 74 и его отсутствие у *K. pneumoniae* 189. Устойчивость бактерий развивалась очень слабо: только в случае *K. pneumoniae* 74 появлялись клетки, устойчивые к 2×МПК азтреонама (3,4 и 2,2 log КОЕ/мл на 72 и 120 ч, соответственно). В обоих экспериментах интенсивная гибель бактерий с 0 по 6 ч сопровождалась значительным увеличением мутности бактериальной суспензии; после 1–2 сут мутность снижалась до значений, характерных для соответствующей численности жизнеспособных клеток.

Эффективность азтреонама в отношении изученных штаммов *K. pneumoniae*, наблюдаемая в динамической системе, не согласовывалась со значениями МПК_{ВИ}: от штаммов с высокой устойчивостью к антибиотику согласно данному параметру можно было ожидать интенсивного вторичного роста, сопровождаемого селекцией клеток

Значения МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М азтреонама в отношении штаммов *K. pneumoniae*
MIC, MIC_{HI} and MIC_M values of aztreonam (MICs at Standard and High Inocula and Mutant Prevention Concentration) of *K. pneumoniae* strains

Штамм <i>K. pneumoniae</i>	МПК, мкг/мл	МПК _{ВИ} , мкг/мл	МПК _М , мкг/мл
74	1 (1)	>256 (1)	2
189	0,25 (0,25)	>256 (0,25)	0,5

Примечание. Приведены значения МПК и МПК_{ВИ}, определенные визуальным и культуральным (указаны в скобках) методами.

Note. The values of MIC and MIC_{HI} determined by visual and cultural (indicated in parentheses) methods are given.

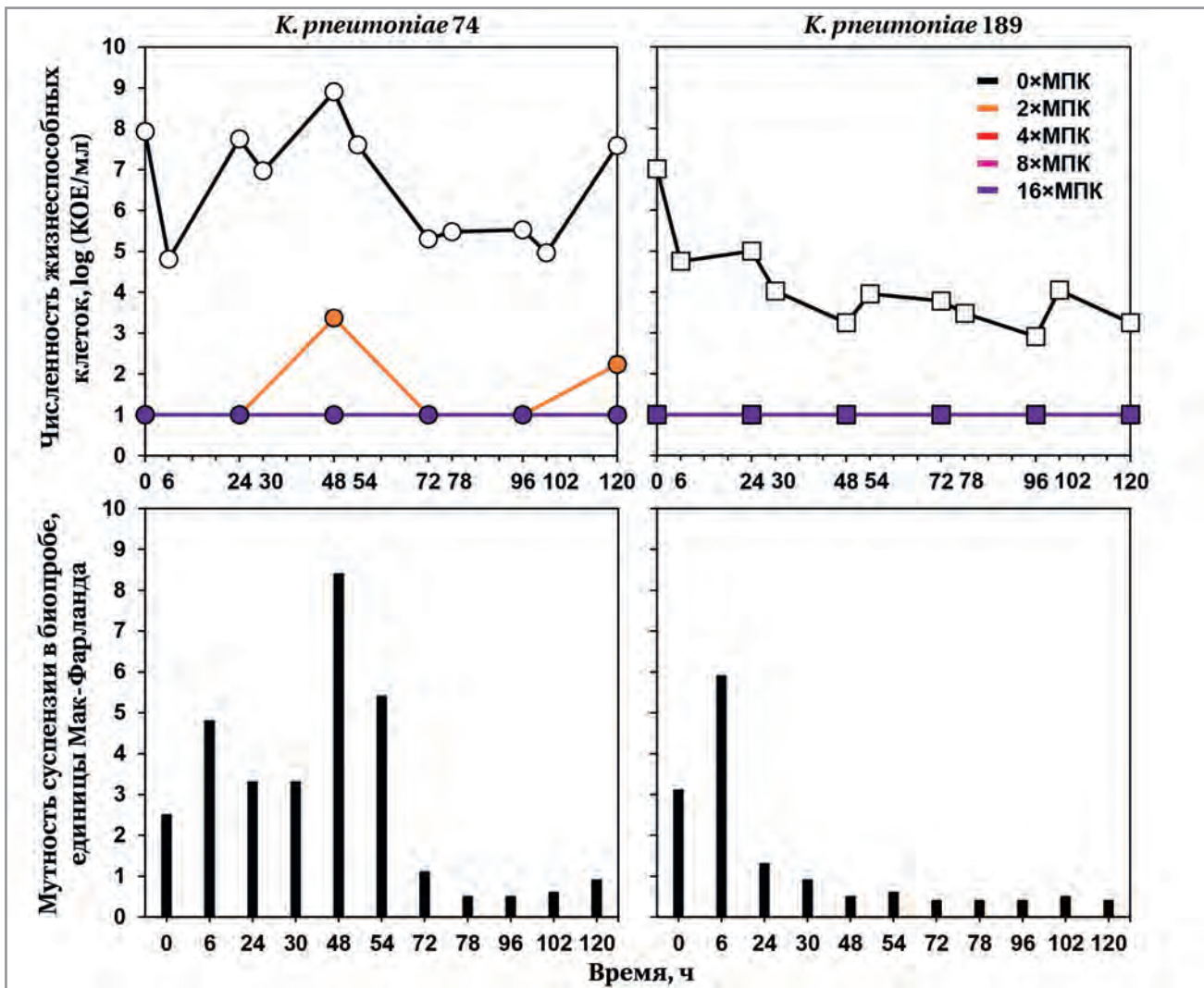


Рис. 1. Численность клеток общей популяции и устойчивых к 2–16×МПК антибиотика субпопуляций *K. pneumoniae* 74 и 189 под воздействием азтреонама в динамической системе *in vitro* и соответствующая мутность бактериальной суспензии в биопробах.

Fig. 1. The bacterial counts of the general population and subpopulations of *K. pneumoniae* 74 and 189 resistant to 2–16×MIC of the antibiotic, exposed to aztreonam in a dynamic system *in vitro*, and the corresponding turbidity of the bacterial suspension in the samples.

различного уровня устойчивости. Обратив внимание на аномальное увеличение мутности при гибели бактерий, мы предположили, что результаты определения МПК_{ви} для объектов нашего исследования могут быть завышены при визуальной оценке. Чтобы уточнить результаты оценки чувствительности к антибиотику, мы определили значения МПК и МПК_{ви} по результатам высева проб из всех лунок планшета с целью определения численности жизнеспособных клеток, находящихся под воздействием азтреонама.

При визуальном определении значений МПК_{ви} азтреонама в отношении обоих штаммов *K. pneumoniae*, мутность была примерно одинаковой во всех рядах планшета с концентрацией от 0,5 до 256 мкг/мл (рис. 2). Высевы показали, что численность клеток *K. pneumoniae* 74 и 189, начиная с концентрации антибиотика 1 и 0,25 мкг/мл,

соответственно, была ниже стартовой численности клеток (рис. 3). Следовательно, данные концентрации азтреонама — это значения МПК_{ви}. При оценке МПК граница мутности в планшете соответствовала границе роста бактерий после высевов. Примечательно, что уточнённые значения МПК_{ви} оказались равны соответствующим значениям МПК и были всего на одно двукратное разведение ниже соответствующих значений МПК_м (см. таблицу).

Итоговая характеристика обоих штаммов согласно значениям МПК и МПК_{ви} — чувствительны к азтреонаму. Такие результаты достаточно хорошо согласуются с результатами экспериментов в динамической системе и с результатами определения значений МПК_м.

Чтобы определить возможную причину сильного помутнения суспензии *K. pneumoniae* после

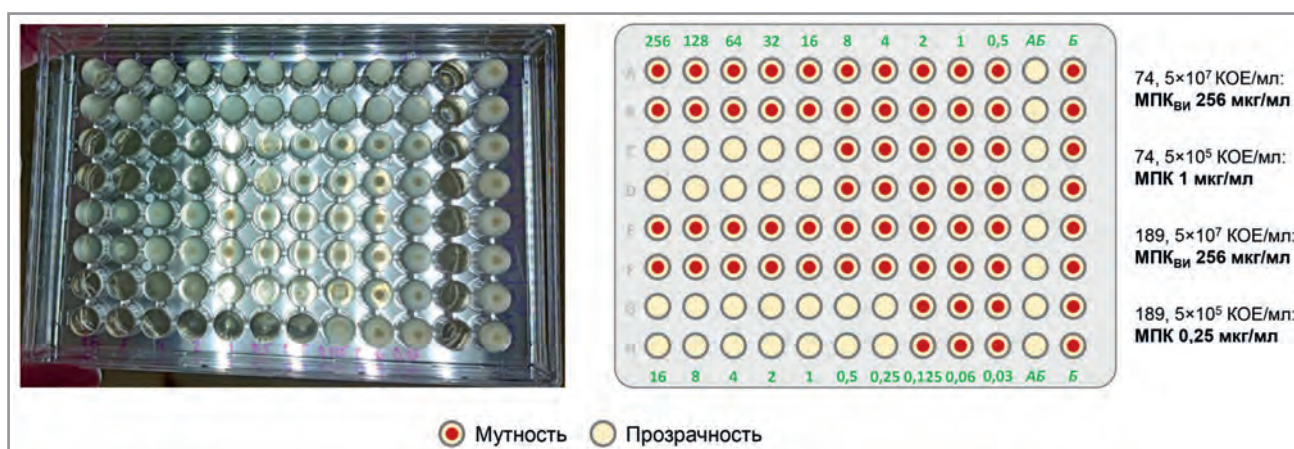


Рис. 2. Результаты определения МПК и МПК₅₀ азтреонама в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189 при визуальной оценке.

Примечание. Концентрации в лунках 0,5–256 мкг/мл для инокулята 5×10^7 КОЕ/мл и 0,03–16 мкг/мл для инокулята 5×10^5 КОЕ/мл. АБ — контроль антибиотика; Б — контроль бактерий. Фото кадрировано и отзеркалено по вертикали.

Fig. 2. Results of determining the MIC and MIC₅₀ of aztreonam against *K. pneumoniae* 74 and 189 by visual assessment.

Note. Concentrations in wells are 0.5–256 µg/ml for an inoculum of 5×10^7 CFU/ml and 0.03–16 µg/ml for an inoculum of 5×10^5 CFU/ml. АБ — antibiotic control; Б — bacteria control. The photo is cropped and mirrored vertically.

воздействия азтреонама, мы изучили морфологию клеток бактерий до и после воздействия антибиотика. До воздействия азтреонама в поле зрения находились мелкие округлые палочки, расположенные одиночно или парами (рис. 4). Под влиянием антибиотика морфология клеток претерпевала сильные изменения: преимущественной формой в поле зрения становились длинные цепочки. Численность клеток согласно микроскопии была выше соответствующей численности, оценённой с помощью культурального метода. Такие результаты показывают, что клетки атипичной морфологии могут быть нежизнеспособны. Можно предположить, что скопления крупных нежизнеспособных клеток являются причиной избыточной мутности, не согласующейся со снижением численности жизнеспособных бактерий.

Обсуждение

В настоящей работе мы изучили эффект азтреонама в отношении *K. pneumoniae* в динамической системе *in vitro* и оценили его соответствие результатам определения чувствительности бактерии к антибиотикам. Эффект азтреонама был умеренным в отношении *K. pneumoniae* 74 и сильным в отношении *K. pneumoniae* 189. Селекция мутантов, соответственно, была слабой или не происходила вовсе. Результаты данного исследования в целом согласуются с гипотезой «окна селекции мутантов» [11]. При определённых значениях МПК (0,25 и 1 мкг/мл) и МПК₅₀ или МПК_М (0,25 и 1 или 0,5 и 2 мкг/мл) «окна селекции мутантов» для обоих штаммов находились ниже профиля азтреонама при моделируемом режиме его дозиро-

вания (минимальная концентрация антибиотика — 3,95 мкг/мл) (рис. 5). В таких условиях развитие устойчивости должно подавляться. В то же время, популяция *K. pneumoniae* 74 под воздействием азтреонама сохраняла высокую жизнеспособность, что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований для изучения этого феномена.

При определении значений МПК азтреонама в отношении *K. pneumoniae* граница мутности соответствовала подавлению роста бактерий, но в случае МПК₅₀ мутность не согласовывалась с концентрацией жизнеспособных клеток в лунках. Это следует учитывать, как возможный фактор, искажающий результаты визуальной оценки значений МПК₅₀ азтреонама.

Увеличение мутности на фоне гибели клеток может быть следствием изменения их морфологии под воздействием азтреонама — образования атипичных громоздких и нежизнеспособных бактериальных форм. Ранее мы изучили морфологию *K. pneumoniae* под воздействием меропенема: у подвергнутых воздействию антибиотика клеток отмечали увеличение размера и образование шарообразной формы, но не наблюдали цепочек, занимающих много пространства в поле зрения [22]. В ряде работ описаны закономерности изменения морфологии клеток в ответ на воздействие антибиотика [23–24]. Завышение значений МПК₅₀ азтреонама и цефалоспоринов при оценке на основе мутности прежде также связывали с образованием филаментных форм у энтеробактерий, включая *K. pneumoniae* [23]. Авторы данной работы рассматривали избыточную мутность как причину «инокулюм эффекта», который

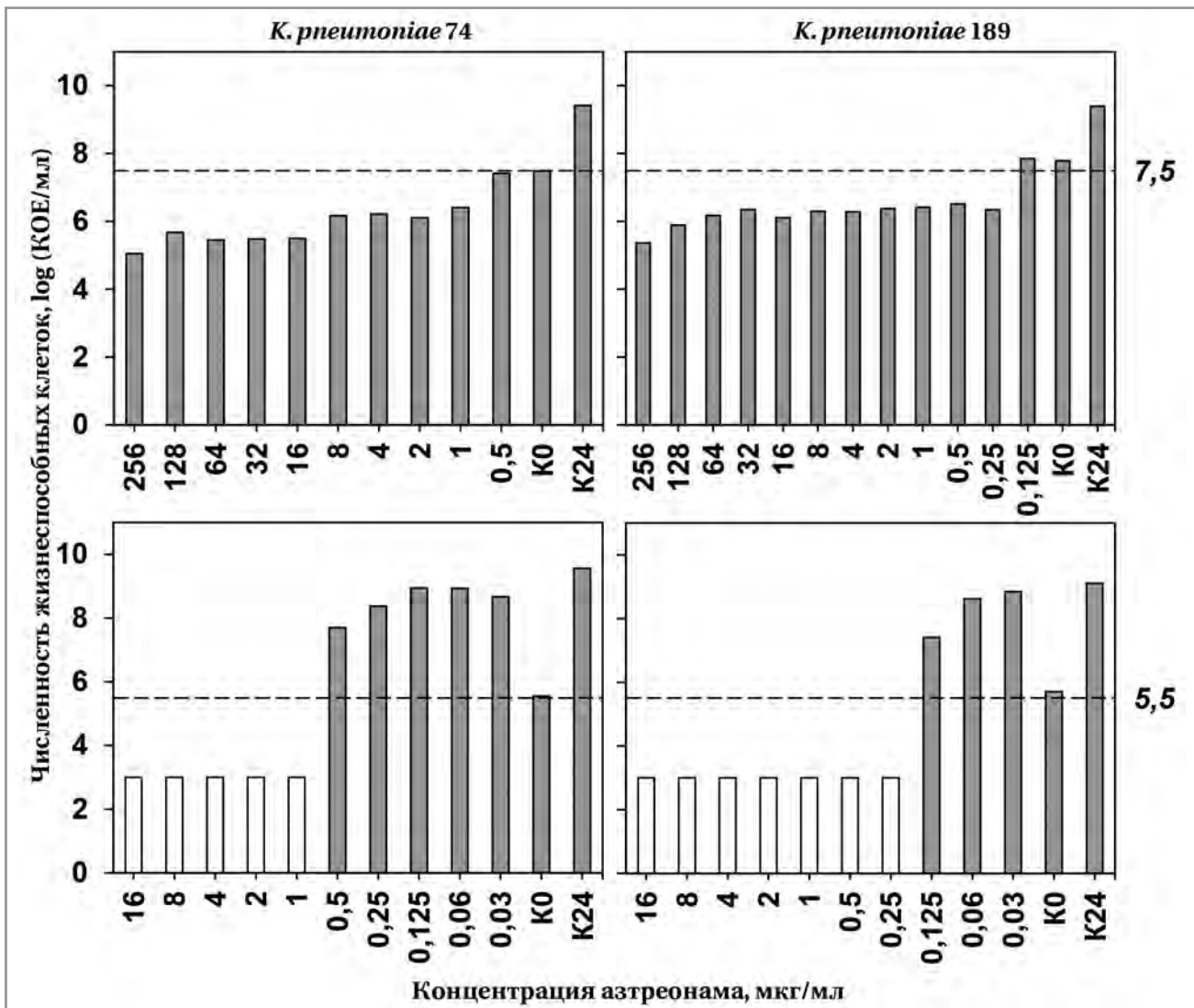


Рис. 3. Результаты определения МПК и МПК_М азтреонама в отношении *K. pneumoniae* после применения культурального метода для оценки численности бактерий.

Примечание. Серый — визуальный рост; белый — отсутствие визуального роста. K0 — контроль бактерий на 0 ч; K24 — контроль бактерий на 24 ч. Пунктиром обозначена исходная численность бактерий (log, КОЕ/мл).

Fig. 3. Results of determining the MIC and MIC_M of aztreonam against *K. pneumoniae* after applying the cultural method to assess the number of bacteria.

Note. Grey — visual growth; white — lack of visual growth. K0 — bacteria control at 0 h; K24 — bacteria control at 24 hours. The dotted line indicates the initial number of bacteria (log (CFU/ml)).

представлялся фактором, мешающим определению МПК при завышении стартовой концентрации бактерий. Мы же рассматриваем «инокулюм эффект» как влияние устойчивых клеток, попадающих в увеличенную выборку, на чувствительность бактерий к антибиотику. Избыточная мутность в рамках наших рассуждений — это фактор, мешающий точному определению МПК_{ви} азтреонама при визуальной оценке. Важно подчеркнуть, что подобного феномена избыточной мутности на фоне активной гибели клеток мы не наблюдали в случае с меропенемом [13]. Для этого антибиотика наблюдалась чёткая корреляция между мутностью и концентрацией клеток в питательной среде, что позволяло определять

значения МПК_{ви} визуально. При этом «инокулюм эффект» обнаруживался у всех изученных штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы, подвергнутых действию меропенема.

Завышение значений МПК_{ви} при визуальной оценке могло быть причиной, по которой они не согласовывались с эффектом антибиотика *in vivo* при увеличенной микробной нагрузке [25]. Чтобы проверить данное предположение, следует провести углублённую оценку МПК_{ви} с различными объектами и определить, для каких из них характерно значительное возрастание мутности питательной среды на фоне интенсивной деформации клеток под действием антибиотика. В то же время, растёт количество работ, где сообщается

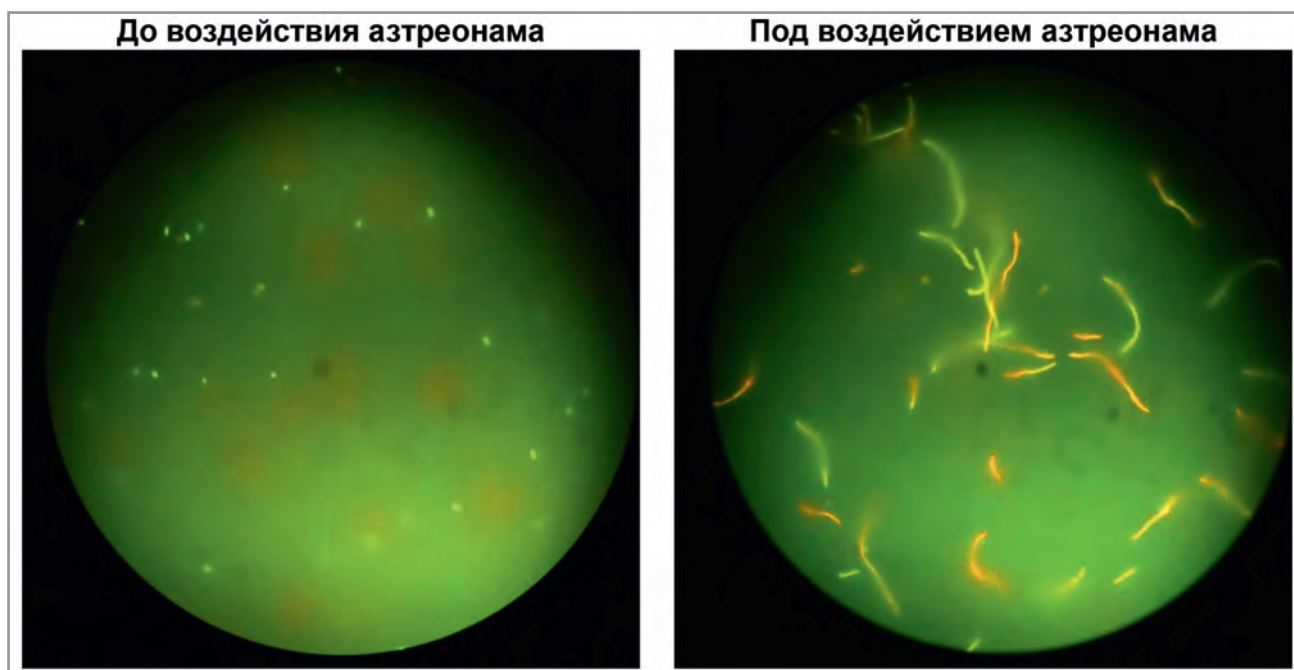


Рис. 4. Морфология клеток *K. pneumoniae* 74 до и после воздействия азтреонама.
Fig. 4. Morphology of *K. pneumoniae* 74 cells before and after exposure to aztreonam.

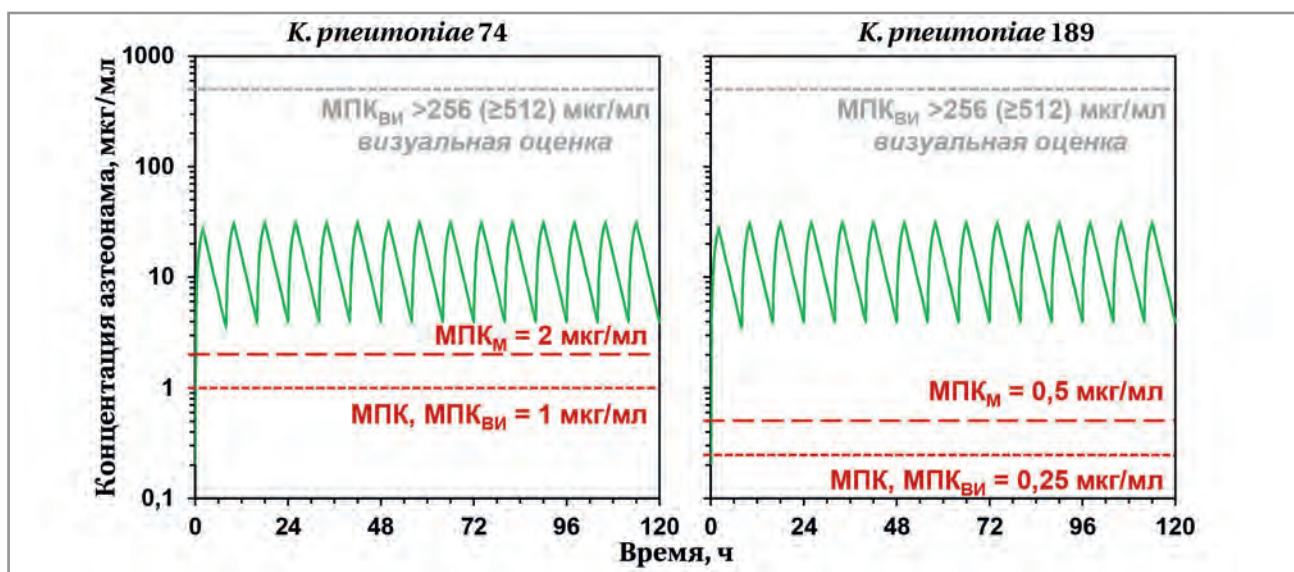


Рис. 5. Расположение моделируемого фармакокинетического профиля азтреонама относительно уровней МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М.

Примечание. Значения МПК_{ВИ} после уточнения с помощью культурального метода.

Fig. 5. Location of the simulated pharmacokinetic profile of aztreonam relative to the levels of MIC, MIC_H and MIC_M values.
Note. MIC_H values after clarification by the cultural method.

о соответствии между «инокулом эффектом» и снижением эффективности антибиотика *in vivo* [26–32]. В данных работах МПК_{ВИ} оценивали визуально, следовательно избыточная мутность может быть характерна для ограниченного количества объектов. Отдельно следует отметить, что оценка МПК_{ВИ} в случае избыточной мутности нуждается в проработке быстрых и простых способов определения численности жизнеспособных клеток: необходимость дополнительных вы-

сегов и культивирования усложняет методику и увеличивает длительность теста.

Значения МПК_{ВИ} после уточнения результатов и значения МПК_М были схожими, что согласуется с результатами проведенного ранее исследования с меропенемом и *K. pneumoniae* [13]. Такие результаты свидетельствуют о том, что МПК_{ВИ} можно продолжать изучать в качестве альтернативного МПК_М параметра для использования в качестве верхнего уровня «окна селекции

мутантов» и прогнозирования развития резистентности бактерий к антибиотикам.

Ограничения исследования

Данное исследование было проведено с двумя штаммами *K. pneumoniae*. Для подтверждения результатов следует провести исследования с большим количеством объектов.

Заключение

Параметр МПК_{ВИ} можно использовать для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму при оценке значений данного параметра по численности жизнеспособных клеток, но не по визуальной границе роста. Параметр МПК_{ВИ} можно рассматривать как альтернативу МПК_М в качестве верхнего уровня «окна селекции мутантов». При определении МПК_{ВИ} необходимо учитывать фактор избыточной мутности в случае объектов тестирования, для которых он характерен.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (№ 22-75-00066).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Алиева К. Н. — общее руководство работой, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов на всех этапах исследования; проведение исследований в динамической системе *in vitro* и оценка динамики численности общей популяции клеток и устойчивых

к антибиотикам субпопуляций культуральными методами; проведение флуоресцентной микроскопии; написание, редактирование и проверка текста публикации. Голикова М. В. — планирование исследования; написание, редактирование и проверка текста публикации; финальное утверждение рукописи. Кондратьева Д. А. — ведение бактериальных культур, оценка чувствительности бактерий к антибиотикам; проверка текста публикации. Кузнецова А. А. — оценка чувствительности бактерий к антибиотикам; проверка текста публикации.

Additional Information

Source of financing. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 22-75-00066).

Conflict of interest. The authors of the article have confirmed that there are no conflicts of interest to disclose.

Authors' participation. Alieva K. N. — general management of the work, research planning, analysis and interpretation of results at all stages of the study; conducting studies in a dynamic *in vitro* system and assessing the dynamics of the total population of cells and antibiotic-resistant subpopulations using cultural methods; performing fluorescence microscopy; writing, editing and checking the text of the publication. Golikova M. V. — research planning; writing, editing and checking the text of the publication; final approval of the manuscript. Kondratyeva D. A. — maintaining bacterial cultures, assessing the susceptibility of bacteria to antibiotics; checking the text of the publication. Kuznetsova A. A. — assessment of the susceptibility of bacteria to antibiotics; reviewing the publication text.

Литература/References

1. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. [Natsional'nyj standart Rossijskoj Federatsii GOST R ISO 20776-1-2022. Issledovanie chuvstvitel'nosti infektsionnykh agentov i otsenka funktsional'nykh kharakteristik izdelij dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. Chast' 1. Referentnyj metod mikrorazvedenij v bul'one dlya laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnnykh agentov po otnosheniyu k bystrorastushchim aerobnym bakteriyam, vyzyvayushchim infektsionnye zabolevaniya. (in Russian)]
2. Baquero M., Galán J.C., del Carmen Turrientes M., Cantón R., Coque T.M., Martínez J.L., et al. Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49 (11): 4754–4756. doi: 10.1128/AAC.49.11.4754-4756.2005.
3. Woodford N., Ellington M.J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 (1): 5–18. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x.
4. Mushtaq S., Vickers A., Ellaby N., Woodford N., Livermore D.M. Selection and characterization of mutational resistance to aztreonam/avibactam in β -lactamase-producing *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 77: 98–111. doi: 10.1093/jac/dkab346.
5. Zaccard C.R., Schell R.F., Spiegel C.A. Efficacy of bilateral bronchoalveolar lavage for diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (9): 2918–2924. doi: 10.1128/JCM.00747-09.
6. Gadsby N.J., McHugh M.P., Russell C.D., Mark H., Conway Morris A., Laurenson I.F., et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Inf.* 2015; 21 (8): 788.e1–788.e13. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.004.
7. Wang H., Gu X., Weng Y., Xu T., Fu Z., Peng W., et al. Quantitative analysis of pathogens in the lower respiratory tract of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine.* 2015; 15: 94. doi: 10.1186/s12890-015-0094-z.
8. Homma T., Hori T., Sugimori G., Yamano Y. Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (11): 3810–3815. doi: 10.1128/AAC.01372-06.
9. Firsov A.A., Smirnova M.V., Strukova E.N., Vostrov S.N., Portnoy Y.A., Zinner S.H. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32: 488–493. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.031.
10. Liang B., Bai N., Cai Y., Wang R., Drlica K., Zhao X. Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (5): 2409–2412. doi: 10.1128/AAC.00975-10.

11. Zhao X., Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. Clin Infect Dis. 2001; 33 (Suppl 3): S147–S156. doi: 10.1086/321841.
12. Lenhard J.R., Bulman Z.P. Inoculum effect of β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2019; 74: 2825–2843. doi: 10.1093/jac/dkz226.
13. Golikova M.V., Strukova E.N., Alieva K.N., Ageevets V.A., Avdeeva A.A., Sulian O.S., et al. Meropenem MICs at standard and high inocula and mutant prevention concentration inter-relations: comparative study with non-carbapenemase-producing and OXA-48-, KPC- and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Antibiotics. 2023; 12: 872. doi: 10.3390/antibiotics12050872.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.0, 2023. Доступно по: <http://www.eucast.org>. Ссылка активна на 16.11.2023.
15. Blaser J., Stone B.B., Zinner S.H. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. J Antimicrob Chemother. 1985; 15 (Suppl A): 131–137. DOI: 10.1093/jac/15.suppl_A.131.
16. Alieva K.N., Golikova M.V., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Strukova E.N., Ageevets V.A., et al. Testing the mutant selection window hypothesis with meropenem: In vitro model study with OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. PLoS ONE. 2023; 18 (8): e0288660. doi: 10.1371/journal.pone.0288660.
17. Lodise T.P., Smith N.M., O'Donnell N., Eakin A.E., Holden P.N., Boissonneault K.R., et al. Determining the optimal dosing of a novel combination regimen of ceftazidime/avibactam with aztreonam against NDM-1-producing Enterobacteriaceae using a hollow-fibre infection model. J Antimicrob Chemother. 2020; 75: 2622–2632. DOI: 10.1093/jac/dkaa197.
18. Xu H., Zhou W., Zhou D., et al. Evaluation of aztreonam dosing regimens in patients with normal and impaired renal function: a population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation analysis. J Clin Pharmacol. 2017; 57: 336–344. doi: 10.1002/jcph.810.
19. Cies J.J., LaCourse R.J., Moore II W.S., Chopra A. Therapeutic drug monitoring of prolonged infusion aztreonam for multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A Case Report. J Pediatr Pharmacol Ther. 2017; 22 (6): 467–470. doi: 10.5863/1551-6776-22.6.467.
20. Feng K., Jia N., Zhu P., Sy S., Liu Y., Dong D., et al. Aztreonam/avibactam effect on pharmacodynamic indices for mutant selection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harbouring serine- and New Delhi metallo- β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2021; 76: 2875–2883. DOI: 10.1093/jac/dkab292.
21. Zhang J., Wu M., Diao S., Zhu S., Song C., Yue J., et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of aztreonam/amoxicillin/clavulanate combination against New Delhi metallo- β -lactamase and serine- β -lactamase co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Pharmaceutics. 2023; 15: 251. doi: 10.3390/pharmaceutics15010251.
22. Alieva K.N., Golikova M.V., Kuznetsova A.A., Zinner S.H. Fluorescence microscopy: determination of meropenem activity against *Klebsiella pneumoniae*. Antibiotics. 2023; 12: 1170. doi: 10.3390/antibiotics12071170.
23. Eng R.H.K., Cherubin C., Smith S.M., Buccini F. Inoculum effect of β -lactam antibiotics on Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 1985; 28 (2): 601–606. doi: 10.1128/aac.28.5.601.
24. Cushnie TPT, O'Driscoll NH, Lamb AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. Cell Mol Life Sci. 2016; 73: 4471–4492. doi: 10.1007/s00018-016-2302-2.
25. Maglio D., Ong C., Banevicius M.A., Geng Q., Nightingale C.H., Nicolau D.P. Determination of the *in vivo* pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* at various inocula. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (6): 1941–1947. doi: 10.1128/AAC.48.6.1941–1947.2004.
26. Szabó D., Máthé A., Filetőth Z., Anderlik P., Rókusz L., Rozgonyi F. *In vitro* and *in vivo* activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (4): 1287–1291. doi: 10.1128/aac.45.4.1287-1291.2001.
27. Mizunaga S., Kamiyama T., Fukuda Y., Takahata M., Mitsuyama J. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 91–96. doi: 10.1093/jac/dki163.
28. Lee D.-G., Murakami Y., Andes D.R., Craig W.A. Inoculum effects of ceftobiprole, daptomycin, linezolid, and vancomycin with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* at inocula of 10^5 and 10^7 CFU injected into opposite thighs of neutropenic mice. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (3): 1434–1441. DOI: 10.1128/aac.00362-12.
29. Harada Y., Morinaga Y., Kaku N., Nakamura S., Uno N., Hasegawa H., et al. *In vitro* and *in vivo* activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: O831–O839. doi: 10.1111/1469-0691.12677.
30. Saeki M., Shinaqawa M., Yakuwa Y., Nirasawa S., Sato Y., Yanagihara N., et al. Inoculum effect of high concentrations of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on the efficacy of cefazolin and other betalactams. J Infect Chemother. 2018; 24 (3): 212–215. doi: 10.1016/j.jiac.2017.10.021.
31. Fantin B., Poujade J., Grégoire N., Chau F., Roujansky A., Kieffer N., et al. The inoculum effect of *Escherichia coli* expressing mcr-1 or not on colistin activity in a murine model of peritonitis. Clin Microbiol Inf. 2019; 25 (12): 1563.e5–1563.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2019.08.021.
32. McNeil J.C., Sommer L.M., Boyle M., Hogan P., Vallejo J.G., Hultén K.G., et al. Cefazolin inoculum effect and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* osteoarticular infections in children. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64 (9): e00703-20. doi: 10.1128/AAC.00703-20.

Поступила / Received 20.02.2024

Принята в печать / Accepted 21.03.2024

Информация об авторах

Алиева Камилла Натиговна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2107-8259. ResearcherID: AAG-6869-2019. eLibrary SPIN-код: 2071-1734. Scopus Author ID: 57197836617

Голікова Марія Владимировна — к. б. н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7588-1733. ResearcherID: O-7873-2016. eLibrary SPIN-код: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Кондратьева Дарья Андреевна — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0009-0008-9953-135X

Кузнецова Анастасия Алексеевна — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2092-5559. eLibrary SPIN-код: 8729-8502

About the authors

Kamilla N. Alieva — Ph. D. in Biology, Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2107-8259. ResearcherID: AAG-6869-2019. eLibrary SPIN: 2071-1734. Scopus Author ID: 57197836617

Maria V. Golikova — Ph. D. in Biology, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7588-1733. ResearcherID: O-7873-2016. eLibrary SPIN: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Daria A. Kondratieva — Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0009-0008-9953-135X

Anastasiya A. Kuznetsova — Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2092-5559. eLibrary SPIN: 8729-8502