

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 615.281.015.21:542.06

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

Поступила в редакцию 16.11.2021

Received 16.11.2021

**Т. В. Артюх**

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно,  
Республика Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «ШАХМАТНОЙ ДОСКИ» И АНАЛИЗА «ВРЕМЕНИ УНИЧТОЖЕНИЯ»**

**Аннотация.** Использование комбинаций антибиотиков является перспективным направлением антибактериальной терапии инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами. Основной целью комбинированной антибиотикотерапии является достижение синергидного эффекта и расширение спектра антибактериальной активности в отношении мультирезистентных микроорганизмов. В связи с наличием у бактерий разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам одной группы микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков трудно прогнозируема. Поэтому для подбора эффективных комбинаций антибиотиков требуется проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного пациента.

В настоящее время в Республике Беларусь комбинированная антибиотикотерапия назначается эмпирически, а в случае ее клинической неэффективности проводится замена препаратов. Одной из причин ограниченного тестирования, несмотря на доступность питательных сред и диагностических материалов, является отсутствие адаптированных для локальных микробиологических лабораторий нормативно-технических методик выявления синергии.

Цель настоящей работы – анализ современных методов исследования эффектов синергии антибактериальных препаратов и возможности их внедрения в практическую медицину.

В результате поиска публикаций в базе данных PubMed на тему повышения антибактериального эффекта антибиотиков по запросу «checkerboard method» and «time-kill» за период с 2016 по 2021 г. было найдено 947 результатов, при этом отмечалась тенденция к росту числа этих исследований.

Метод «шахматной доски» и анализ «time-kill» являются наиболее распространенными и надежными тестами *in vitro*, которые отражают эффекты, получаемые при комбинации антибиотиков как друг с другом, так и с другими соединениями.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, комбинации антибиотиков, синергия, метод «шахматной доски», анализ «time-kill»

**Для цитирования:** Артюх, Т. В. Изучение синергии антибактериальных препаратов с использованием метода «шахматной доски» и анализа «времени уничтожения» / Т. В. Артюх // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 332–342. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

**Tatiana V. Artyukh**

*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

## **STUDYING SYNERGY OF ANTIBACTERIAL DRUGS USING THE “CHECKERBOARD” METHOD AND THE “TIME-KILL” ANALYSIS**

**Abstract.** The use of combinations of antibiotics is a promising area of antibiotic therapy of bacterial infections caused by antibiotic-resistant strains. The main goal of combined antibiotic therapy is to achieve a synergistic effect and to expand a spectrum of antibacterial activity against multi-resistant microorganisms. Due to the presence of various mechanisms of resistance in bacteria, even to drugs of the same group, the microbiological efficacy of antibiotic combinations is difficult to predict. Therefore, to select effective combinations of antibiotics, it is required to conduct a microbiological testing of isolates isolated from a particular patient.

Currently, in the Republic of Belarus, the appointment of combined antibiotic therapy is carried out empirically, and in the event of its clinical ineffectiveness, the drugs are replaced. One of the reasons for a limited testing, with the availability of culture media and diagnostic materials, is the lack of regulatory and technical methods for identifying synergy adapted to local microbiological laboratories.

The purpose of this publication was to analyze the literature data illustrating the relevance of analyzing the methods for studying the effects of synergy of antibacterial drugs and the possibility of their introduction into practical medicine.

As a result of a search for publications in the PubMed database on the topic of increasing the antibacterial effect of antibiotics on the request the “checkerboard” method and the “time-kill” analysis for the period from 2016 to 2021, 947 results were found with an upward trend in research.

“Checkerboard” and “time-kill” assays are the most common, reliable *in vitro* tests that reflect the effects of antibiotic combinations and the effects of antibiotic combinations with other compounds.

**Keywords:** antibiotic resistance, antibiotic combinations, synergy, “checkerboard method”, “time-kill” analysis

**For citation:** Artyukh T. V. Studying synergy of antibacterial drugs using the “checkerboard” method and the “time-kill” analysis. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalogichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 332–342 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

**Введение.** В течение длительного времени эффекты синергии антибактериальных препаратов и механизмы, лежащие в их основе, оставались неизученными. Началу исследований синергии способствовало распространение множественной лекарственной устойчивости вследствие появления возбудителей, с трудом поддающихся лечению традиционными методами [1].

В настоящее время в сфере здравоохранения встречаются устойчивые штаммы следующих микроорганизмов: метициллин- и ванкомицин-устойчивый *Staphylococcus aureus*; группа микробов, имеющих бета-лактамазу (семейство *Enterobacteriaceae* и др.); мультирезистентная *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida*; карбапенем-устойчивый *Acinetobacter*; ванкомицин-устойчивые *Enterococcus*; *Streptococcus* группы А, устойчивый к эритромицину и другим препаратам [2]. Согласно отчету «об угрозах дополнительной реальности», ежегодно в США выявляют более 2,8 млн устойчивых к антибиотикам инфекций, в результате которых умирают более 35 тыс. человек. Кроме того, затраты на лечение инфекций могут достигать 4,5 млрд долларов в год [3]. Доступность, широкое и необоснованное применение антибиотиков привело к тому, что антибиотикорезистентность стала глобальной проблемой, которая указывает на необходимость разработки новых препаратов, активных в отношении резистентных микроорганизмов, или мониторинга уже известных на наличие синергетических антибактериальных эффектов.

Известно, что комбинации антибактериальных средств могут повысить эффективность антибиотиков и снизить устойчивость к антибактериальным препаратам за счет независимых, синергических эффектов. Комбинированная терапия широко используется для лечения рака, вирусных и микобактериальных инфекций. Однако по причине сложности утверждения регулируемыми органами антибактериальных препаратов комбинации данных веществ только сейчас включены в общую стратегию лечения бактериальных инфекций [4].

Для понимания эффекта синергии необходимо ввести термин «аддитивность», означающий отсутствие взаимодействия или инертность. Именно проблема математического определения аддитивности была предметом споров среди ведущих исследователей этой темы в течение последнего столетия. Любое отклонение от аддитивности рассматривается как синергизм (супераддитивность, потенцирование, коализм) или антагонизм (субаддитивный эффект, отрицательная синергия). Эффекты антагонизма интересуют исследователей (за исключением токсикологов) в меньшей степени. Синергия же вызывает особый интерес, поскольку подразумевает достижение терапевтического эффекта при использовании меньшего количества компонентов препарата, а также снижение числа побочных эффектов [4].

Наибольшую ясность в формулировку термина «эффект синергии» внес М. С. Berenbaum (1989 г.). Предложенный им изоболесический метод включает модели как *in vitro*, так и на животных. Метод позволяет наглядно продемонстрировать взаимодействие доз отдельных компонентов (рис. 1) [5].

Согласно результатам тематических исследований, выявлены следующие механизмы достижения синергии антибактериальных препаратов [6]:

1. *Фармакокинетические или физико-химические эффекты, связанные с улучшением растворимости, скоростью резорбции и повышением биодоступности.* Для преодоления снижения биодоступности рифампицина в сочетании с изониазидом разработаны энтеросолюбильные микрочастицы для контролируемого высвобождения данных препаратов, что повысило их биодоступность в 9 раз [7].

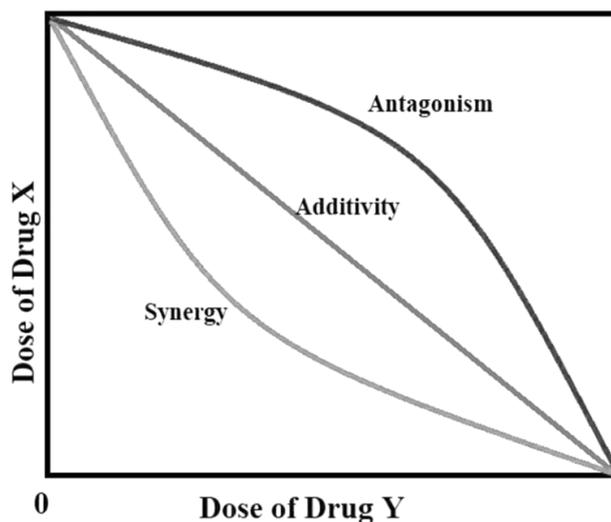


Рис. 1. Изобола различных видов взаимодействия веществ: отсутствие взаимодействия – аддитивный эффект; антагонизм – негативное взаимодействие; синергия – позитивное взаимодействие [5]

Fig. 1. Isobol of various types of interaction of substances: lack of interaction – additive effect; antagonism – negative interaction; synergy – positive interaction [5]

2. *Достижение синергии через многоцелевые эффекты.* Основные цели воздействия лекарственных препаратов – ферменты, субстраты, метаболиты, рецепторы, ионные каналы, транспортные белки, ДНК, РНК, рибосомы, моноклональные антитела и физико-химические механизмы. Эффект синергии возникает, если действие отдельных составляющих веществ в смеси направлено на разные цели-мишени. Примером многоцелевого принципа терапии может служить препарат Иберогаст, в состав которого входит 9 лекарственных растений. В зависимости от исходного состояния препарат оказывает двойное действие на желудочно-кишечный тракт: с одной стороны – расслабляет, с другой – повышает тонус [8].

3. *Устранение или нейтрализация неблагоприятных воздействий содержащихся в препарате или добавленных к нему веществ в целях повышения его эффективности.* Назначение пробиотиков в комплексной терапии антибиотиками широкого спектра действия вполне оправданно, поскольку штаммы, отличающиеся устойчивостью к антибиотикам, способствуют восстановлению нормальной кишечной флоры. Такой подход дает возможность значительно уменьшить число и степень тяжести возможных осложнений [9].

4. *Блокирование механизмов резистентности бактерий.* Примером преодоления антибиотикорезистентности является использование ингибиторов бета-лактамаз в сочетании с пеницилинами или цефалоспорином в составе комбинированных препаратов. Ингибиторы бета-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) обеспечивают инактивацию микробных ферментов до того, как последние успевают расщепить –С–N-связь в структуре антибиотика. Также показано, что синергия нитрофуран/дезоксихолат/ванкомицин против энтеробактерий реализуется через блокаду отводящих насосов грамотрицательных бактерий [10].

Однако в настоящее время существует множество примеров синергического взаимодействия веществ, механизмы действия которых еще научно не обоснованы (изучение их природы требует проведения дополнительных исследований) [11, 12].

Началу исследований синергии в практических лабораториях способствовало применение новых методов в молекулярной биологии и аналитической химии. В то же время большинство современных методик определения эффективности антибактериальных препаратов опирается на классические показатели минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК). МИК определяется как самая низкая концентрация противомикробного агента, которая предотвращает видимый рост микроорганизмов, МБК – как самая низкая концентрация антимикробного агента, необходимая для полного уничтожения микроорганизмов (уменьшение исходного посевного материала на 99,9 % за 18–24 ч).

В результате поиска публикаций в базе данных PubMed на тему повышения антибактериального эффекта антибиотиков по запросу «synergy of antibiotics» за период с 2016 по 2021 г. было найдено 1537 результатов. Фильтр-клинические исследования за период с 2019 г. показали, что метод «шахматной доски» и анализ на антимикробную эффективность под названием «time-kill» (определение скорости гибели бактериальных клеток или анализ «времени уничтожения») являются наиболее часто используемыми количественными методиками в измерении эффектов антибактериальной синергии.

**Метод «шахматной доски».** Измерение синергии с помощью метода «шахматной доски» используется для определения влияния на антимикробную эффективность комбинации антибиотиков по сравнению с их индивидуальной активностью. Это сравнение представлено как значение индекса фракционной ингибирующей концентрации (ФИК). Значение индекса ФИК учитывает комбинацию антибиотиков, которая дает наибольшее отклонение от МИК отдельного антибиотика. Для количественной оценки взаимодействий между тестируемыми антибиотиками (индекс ФИК) используется следующее уравнение [13]:

$$\sum \text{ФИК} = \frac{\text{МИК}_{\text{Ac}}}{\text{МИК}_{\text{A}}} + \frac{\text{МИК}_{\text{Bc}}}{\text{МИК}_{\text{B}}},$$

где  $\text{МИК}_{\text{Ac}}$  – минимальная подавляющая концентрация первого антибиотика, взятого в сочетании со вторым антибиотиком или иным веществом, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{A}}$  – минимальная подавляющая концентрация первого антибиотика, взятого как монопрепарат, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{Bc}}$  – минимальная подавляющая концентрация второго антибиотика или иного вещества, взятого в сочетании с первым антибиотиком, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{B}}$  – минимальная подавляющая концентрация второго антибиотика или иного вещества, мкг/мл.

Затем значение индекса ФИК используется для категоризации взаимодействия двух протестированных антибиотиков. Авторы метода предлагают следующую трактовку индекса ФИК [13]:

*синергия* – комбинация соединений увеличивает ингибирующую активность (снижение МИК) одного или обоих соединений, чем соединения по отдельности ( $\text{ФИК} < 0,5$ );

*отсутствие взаимодействия* – комбинация не имеет увеличения ингибирующей активности из-за аддитивного эффекта обоих соединений вместе ( $\text{ФИК} = 0,5-4$ );

*антагонизм* – комбинация соединений увеличивает МИК или снижает активность отдельных соединений ( $\text{ФИК} > 4$ ).

Выполнение метода «шахматной доски» возможно в автоматизированном и ручном варианте. Ручной режим требует кропотливого расчета разведений исследуемых веществ и подвержен ошибкам в большей мере, чем автоматизированный. Исследования проводят в 96-луночных полистироловых планшетах. Схема анализа представлена на рис. 2. Готовят необходимые концентрации рабочих растворов исследуемых веществ А и В с известными для исследуемого штамма МИК. В лунки стерильного плоскодонного планшета слева направо вносят разведения веществ А для создания двукратного серийного убывающего градиента концентрации в диапазоне  $8-0,125$  МИК. В лунках по направлению сверху вниз создают двукратный серийный убывающий градиент концентрации для вещества В в том же диапазоне. Заданные концентрации, полученные на бульоне Мюллера–Хинтона, вносятся в ячейки, после чего планшет инокулируют суспензией исследуемой культуры [14]. Контроли используют для регистрации значений МИК тестируемых соединений, а ингибирующие концентрации соединений А и В позволяют рассчитывать значения ФИК с применением указанной выше формулы.

После инкубации производят учет результатов, сравнивая опытные лунки с контрольными: лунка H2 для вещества А –  $\text{МИК}_{\text{A}} = 128$  мкг/мл, лунка B12 для вещества В –  $\text{МИК}_{\text{B}} = 4$  мкг/мл. Разведения в лунках с прозрачным содержимым принимают за МИК комбинаций исследуемых веществ и рассчитывают ФИК. Расчет ФИК производят по прозрачным лункам, находящимся вблизи диагонали H1 ... A12. Таким образом,  $\text{МИК}_{\text{Ac}}$  вещества А в эффективном сочетании с веществом В составила 8 мкг/мл, а  $\text{МИК}_{\text{Bc}}$  вещества В в эффективном сочетании с веществом А – 1 мкг/мл (рис. 2).

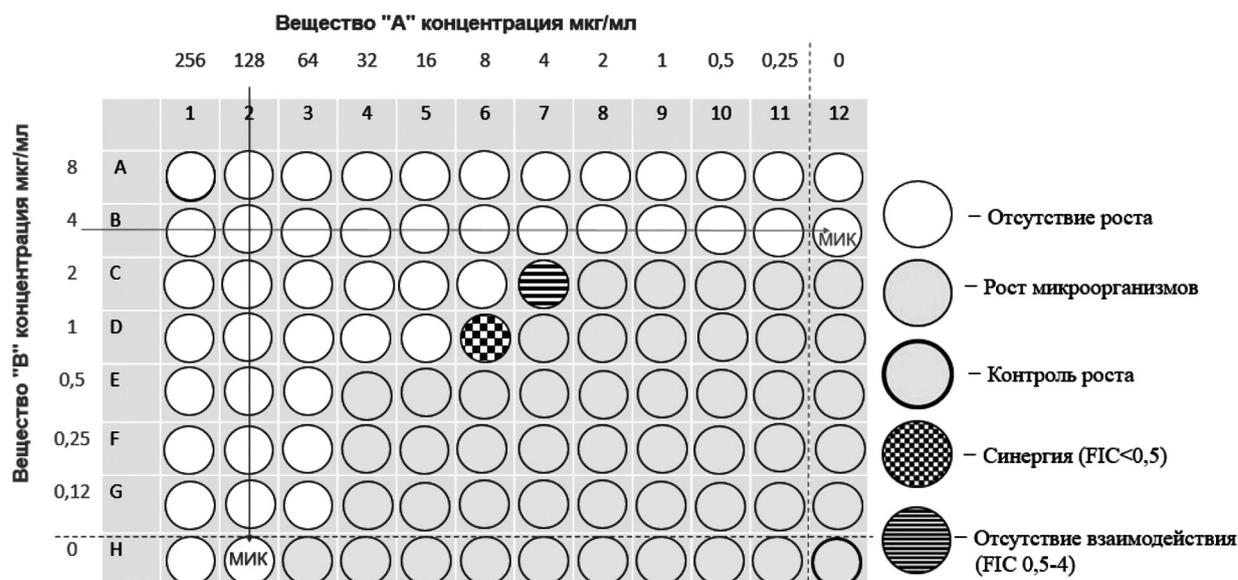


Рис. 2. Схема применения метода «шахматной доски»

Fig. 2. Scheme of the use of the “checkerboard” method

На основании значения ФИК комбинации соединений (лунки, проявившие ингибирующий эффект) оценивают на синергизм, аддитивность или антагонизм [14]: ФИК лунки D6 =  $8/128 + 1/4 = 0,31$  (синергидный эффект), ФИК лунки C7 =  $4/128 + 2/4 = 0,53$  (отсутствие взаимодействия).

Микробиологическое заключение проведенного исследования оформляют с указанием индивидуальных значений МИК антибиотиков, значения индекса ФИК, интерпретации результата взаимодействия для комбинации антибиотиков (синергизм, отсутствие взаимодействия или антагонизм).

Комбинированное бактерицидное тестирование получило широкое применение с начала XXI в. По результатам исследования 119 изолятов *V. septicus*, выделенных у пациентов с муковисцидозом, 50 % были устойчивы ко всем протестированным антибиотикам, 8 % – ко всем комбинациям антибиотиков с двумя препаратами. Тройные комбинации антибиотиков, которые содержали тобрамицин, меропенем и дополнительный антибиотик, были наиболее эффективными в отношении 81–93 % устойчивых штаммов *V. septicus* [15]. Еще одно рандомизированное исследование показало, что комбинированная антибактериальная терапия β-лактамом и аминогликозидом превосходит монотерапию антибиотиками у пациентов с обострениями муковисцидоза, которые колонизированы мультирезистентными штаммами *P. aeruginosa* [16]. Однако относительно пациентов с муковисцидозом нет достаточных доказательств того, что сложное рутинное использование тестирования комбинаций антибиотиков улучшает клинические результаты [17].

С помощью усовершенствованного метода «шахматной доски» CombiANT было продемонстрировано, что комбинации триметоприм + нитрофурантоин и триметоприм + мециллинам показывают синергизм, но только для определенных изолятов *E. coli*, тогда как комбинации мециллинам + нитрофурантоин показывают антагонистические взаимодействия для всех протестированных штаммов *E. coli* [18].

Недавно разработанный ингибитор β-лактамаз – таниборбактам тестировали с помощью метода «шахматной доски» в комбинации с цефепимом на 129 изолятах *Enterobacterales*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра. Комбинация цефепим + таниборбактам продемонстрировала потенцированную активность в отношении изолятов, восстановив чувствительность всех энтеробактерий и 64 % изолятов *P. aeruginosa* [19].

Одним из немногих доступных вариантов борьбы с карбапенем-резистентными штаммами является колистин. Однако во всем мире наблюдается снижение антибактериальной активности данного препарата-резерва. В связи с этим проводятся исследования по оптимизации эффективных

антибактериальных комбинаций с использованием метода «шахматной доски». По результатам исследований синергизм тигециклина в сочетании с амикацином или гентамицином составил 8,2 %. Аддитивная активность наблюдалась в 75,5 % изолятов для тигециклин + амикацин и в 69,4 % изолятов для тигециклин + гентамицин, при этом антагонизма не наблюдалось. На основании полученных данных о фракционных ингибирующих концентрациях можно улучшить оптимальное дозирование антибиотиков. Общая рекомендуемая доза комбинированных схем включает 200 мг тигециклина и 25 мг/кг амикацина или 7 мг/кг гентамицина, затем 100 мг тигециклина каждые 12 ч и 15 мг/кг амикацина или 5 мг/кг гентамицина каждые 24 ч. Таким образом, тигециклин в сочетании с аминогликозидами может быть потенциальным режимом против карбапенем-резистентных штаммов [20].

Метод «шахматной доски» направлен на выявление синергидного эффекта при сочетанном воздействии антибиотиков на бактериальную клетку при лечении заболеваний, вызванных микроорганизмами с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью. Высокой резистентностью к антибиотикам обладают также бактерии, склонные к образованию микробных биопленок. Известно, что МИК антибиотиков в отношении бактерий в составе биопленок может в тысячи раз превышать этот показатель для планктонных форм бактерий [21]. Таким образом, метод «шахматной доски» перспективен для мониторинга эффективности комбинаций антибиотиков на разрушение и элиминацию микробных биопленок.

**Анализ «time-kill»** относят к современным методам диагностики. Первые исследования с использованием данного метода описаны в 1986 г. Krogstad и Moellering. Метод основан на количественной оценке антимикробной активности после подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованных средах при высеве разведений опытных образцов. Измерение синергии с помощью анализа «time-kill» используется для отражения временной характеристики воздействия антибактериальных препаратов. Патогенные микроорганизмы могут переживать антибиотическую атаку, проявляя свойства персистенции, при этом инфекционный процесс продолжается. В связи с этим важно определение зависимости между бактерицидным действием антимикробных средств и временем экспозиции их воздействия на микроорганизм не в одной временной точке – через 24 ч инкубации, а в нескольких – через 4, 8, 12 и 24 ч. Это осуществляется путем подсчета жизнеспособности бактериальных штаммов через разные временные интервалы.

Микробиологическое заключение, результат исследования визуализируются с помощью графика (так называемая кривая зависимости «время – летальное действие») (рис. 3) [22]. Штаммы

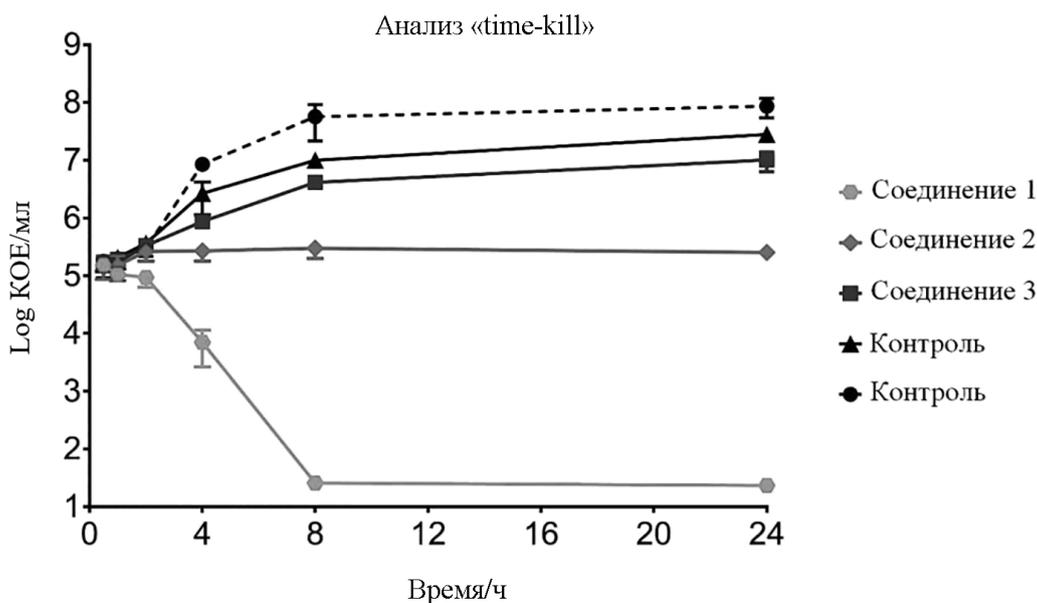


Рис. 3. Кривая зависимости «время – летальное действие»

Fig. 3. Dependency curve “time-kill”

бактерий, как правило, наносят на ось  $Y$  в логарифмическом масштабе, соответствующее время – на ось  $X$  арифметической шкалы.

В этом примере (рис. 3) соединение 1 проявляет бактерицидный эффект, снижая исходный логарифм КОЕ/мл более чем на три логарифма. Соединение 2 проявляет бактериостатический эффект, поскольку  $\log$  КОЕ/мл с течением времени остается таким же, как и при исходной концентрации  $\log$  КОЕ/мл. Соединение 3 проявляет слабый противомикробный эффект, так как бактерии в присутствии этого соединения со временем растут до уровня, аналогичного контрольному.

С помощью анализа «time-kill» проведено моделирование для оценки противомикробных препаратов против *N. gonorrhoeae*. Исследование показало, что цефтриаксон, цефиксим и бензилпенициллин проявляют зависящие от времени бактерицидные свойства, что позволяет улучшить стратегии дозирования для лечения гонореи [23].

В экспериментах с анализом «time-kill» против *K. pneumoniae*, продуцирующей карбапенемазы, изучены эффекты имипенема и дорипенема. Показано, что их активность в присутствии релебактама значимо не различается. Максимальное снижение числа бактерий ( $2\log-2,5\log$  КОЕ/мл) наблюдалось при схемах, содержащих 30 мг/л имипенема или дорипенема. Также выявлено снижение количества бактерий в первые 8 ч в зависимости от концентрации, что позволяет оптимизировать режим дозирования [24].

Помимо определения толерантности к бактерицидной концентрации антибиотиков анализ «time-kill» позволяет охарактеризовать эффекты синергии между противомикробными средствами с точки зрения скорости их действия. Также с помощью данного метода, в отличие от описанного выше, возможно изучение синергии антибиотиков с веществами, которые самостоятельно не проявляют бактерицидных и бактериостатических эффектов, но в комбинации с антибиотиком усиливают его антибактериальный эффект. Анализ применяется для оценки эффективности комбинаций антисептических средств местного действия и прогнозирования их дозы, модуляции резистентности на образование биопленки и определения времени гибели бактерий с множественной лекарственной резистентностью в зависимости от комбинаций антибиотиков.

В первых (1987 г.) публикациях по изучению согласованности результатов применения описанных выше методов («шахматной доски» и «time-kill») не наблюдается полного соответствия. Так, фракционные ингибирующие и бактерицидные концентрации при проведении исследований с применением метода «шахматной доски» сравнивали с результатами «time-kill» анализа и наоборот. Общее согласие МИК и МБК составило 39,4 и 40,9 % соответственно [25]. Данное исследование показывает отсутствие согласованности между методами в демонстрации синергизма антимикробных препаратов. Однако со временем показатели согласованности достигли 88 %, что связывают с совершенствованием авторских методик и появлением автоматизированных вариантов их исполнения.

Динамика устойчивости к антибактериальным препаратам растет из года в год. К 2019 г. распространенность инвазивных штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к карбапенемазам, в Беларуси достигала 75 % (данные объединенного проекта EARS-Net и CAESAR, 2019) [26].

Протоколы, выпущенные в первую волну COVID-19, предусматривали широкое назначение антибиотиков, что неоправданно способствовало селекции устойчивости. Результаты большого метаанализа показывают, что частота бактериальных ко-инфекций среди пациентов с COVID-19 составила 7 %, антимикробную терапию при этом получали 72 % [27]. Помимо того, освещение средствами массовой информации результатов исследований привело к необоснованному предположению, что комбинация азитромицина с гидроксихлорохином эффективна при COVID-19. Несмотря на хорошо известные побочные эффекты гидроксихлорохина на сердечно-сосудистую систему и тот факт, что предварительные данные не показали эффективности комбинации для лечения больных COVID-19, это предположение привело к чрезмерному использованию азитромицина в комбинации с гидроксихлорохином. Тактика использования антибиотиков в лечении больных COVID-19 неизбежно ведет к росту вторичной лекарственной устойчивости потенциально патогенных микроорганизмов к часто назначаемым антибиотикам [28]. Так, штаммы

*K. pneumoniae*, выделенные от пациентов с COVID-19, характеризовались множественной устойчивостью к антибиотикам, в том числе устойчивостью высокого уровня к колистину. Распространение подобных штаммов в дальнейшем может значительно затруднить проведение этиотропной терапии [29].

**Заключение.** Классический синтез новых антибиотиков не может сдерживать появление и распространение множественной лекарственной устойчивости. В связи с этим необходимы дополнительные стратегии для расширения терапевтических возможностей за счет синергетических комбинаций веществ, проявляющих антибактериальные эффекты. Недавно проведенный метаанализ, включавший 2841 респондента, выявил более низкую смертность среди пациентов, получавших комбинированную терапию, по сравнению с пациентами, получавшими монотерапию [30]. Такой подход выглядит многообещающим в преодолении резистентности и может быть реализован через использование методов тестирования бактерицидности в различных комбинациях.

Метод «шахматной доски» и анализ «time-kill», а также их модификации являются наиболее распространенными и надежными тестами *in vitro*, которые отражают эффекты комбинаций антибиотиков. Автоматизированный режим метода «шахматной доски» является высокопроизводительным скринингом, а анализ «времени уничтожения» показывает дополнительные характеристики синергетических эффектов.

Поскольку в настоящее время назначение комбинированной антибиотикотерапии проводится эмпирически и в случае ее клинической неэффективности необходима микробиологическая верификация диагноза с последующим рациональным выбором этиотропного лечения, описанные методы исследования синергии могут быть адаптированы для микробиологических лабораторий с целью перехода от исследовательского тестирования комбинаций антибиотиков к рациональному, клинически значимому. Это позволит повысить компетентность специалистов и проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного пациента, в лабораториях любой оснащенности с минимальными экономическими затратами.

### Список использованных источников

1. Eliopoulos, G. M. Antibiotic combinations: Should they be tested? / G. M. Eliopoulos, S. T. Eliopoulos // Clin. Microbil. Rev. – 1988. – Vol. 1, N 2. – P. 139–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139>
2. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains / D. V. Tapalski [et al.] // Rus. Clin. Lab. Diagn. – 2021. – Vol. 66, N 5. – P. 304–309. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>
3. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States / R. E. Nelson [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 72, N 1. – P. 17–26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1581>
4. The future of antibiotics begins with discovering new combinations / M. Zhu [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2021. – Vol. 1496, N 1. – P. 82–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14649>
5. Ma, J. Current methods for quantifying drug synergism / J. Ma, A. Motsinger-Reif // Protein Bioinform. – 2019. – Vol. 1, N 2. – P. 43–48.
6. Вагнер, Х. Исследование синергии: создание нового поколения фитопрепаратов / Х. Вагнер, Г. Ульрих-Мерцених // Рус. мед. журн. Мед. обозрение. – 2016. – Т. 24, № 3. – С. 183–189.
7. Duarte, F. Gastric-resistant isoniazid pellets reduced degradation of rifampicin in acidic medium [Electronic resource] / F. Duarte [et al.] // Braz. J. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 50, N 4. – P. 749–755. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400010>
8. Король, Л. А. Иберогаст – эффективная фитотерапия функциональных заболеваний желудочнокишечного тракта / Л. А. Король, С. А. Скатков // Терапия. – 2016. – № 5. – С. 88–95.
9. Gut-brain-microbiota axis: antibiotics and functional gastrointestinal disorders / T. Karakan [et al.] // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 389. <https://doi.org/10.3390/nu13020389>
10. *In vitro* combined inhibitory activities of  $\beta$ -Lactam antibiotics and clavulanic acid against blaKPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* / M. Peng [et al.] // Infect. Drug Resist. – 2021. – Vol. 14. – P. 361–368. <https://doi.org/10.2147/IDR.S292612>
11. Антимикробная и противогрибковая активность экстрактов лишайников, распространенных на территории Беларуси / Д. В. Тапальский [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2017. – № 2. – С. 60–65.
12. Синергидное действие катионного пептида хоминина и нового дезинфектанта на основе изохинолина на образование биопленок полирезистентных стафилококков / Л. И. Кононова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65. – № 5–6. – С. 11–18.

13. Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them / F. C. Odds // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2003. – Vol. 52, N 1. – P. 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
14. Тапальский, Д. В. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью : инструкция по применению / Д. В. Тапальский, Л. В. Лагун. – Гомель : Гомел. гос. мед. ун-т, 2017. – 27 с.
15. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia* / S. D. Aaron [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 4, N 1. – P. 1206–1212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9907147>
16. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / B. J. Lang [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 162, N 6. – P. 2241–2245. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.2005018>
17. Antimicrobial synergy testing: comparing the tobramycin and ceftazidime gradient diffusion methodology used in assessing synergy in cystic fibrosis-derived multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / I. N. Okoliegbe [et al.] // *Antibiotics.* – 2021. – Vol. 10, N 8. – Art. 967. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080967>
18. ComBIANT: Antibiotic interaction testing made easy / N. Fatsis-Kavalopoulos [et al.] // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18, N 9. – P. e3000856. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000856>
19. Activity of cefepime in combination with the novel  $\beta$ -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133) against extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates in *in vitro* checkerboard assays / W. Kloezen [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2021. – Vol. 65, N 4. – P. e02338-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02338-20>
20. Тапальский, Д. В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков, продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси / Д. В. Тапальский // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 182–191.
21. Артюх, Т. В. Особенности резистентности клинических изолятов *E. coli* и *C. albicans*, образующих биопленку / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, О. Б. Островская // *Вестн. ВГМУ.* – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 46–54.
22. Адамович, Т. Г. Методы изучения антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* / Т. Г. Адамович, И. А. Гаврилова, Е. Ю. Кирильчик // *Современные технологии в медицинском образовании : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та, Минск, 1–5 нояб. 2021 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол. : С. П. Рубникович [и др.].* – Минск, 2021. – С. 1540–1543.
23. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae* / S. Foerster [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2016. – Vol. 16. – Art. 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>
24. Predicting the effects of Carbapenem/Carbapenemase inhibitor combinations against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-kill experiments: alternative versus traditional approaches to MIC determination / A. V. Filimonova [et al.] // *Antibiotics.* – 2021. – Vol. 10, N 12. – Art. 1520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121520>
25. Chan, E. L. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas* / T. L. Chen, R. J. Zabransky // *Microb. Drug Resist.* – 1987. – Vol. 6, N 2. – P. 157–164. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90101-5)
26. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Европе – 2019 г. [Электронный ресурс] // Ежегодный доклад Европейского Регионального бюро ВОЗ. – Режим доступа: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf). – Дата доступа: 13.01.2022.
27. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis / L. Lansbury [et al.] // *J. Infect.* – 2020. – Vol. 81, N 2. – P. 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
28. Синопальников, А. И. Пандемия COVID-19 – «пандемия» антибактериальной терапии / А. И. Синопальников // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2021. – Т. 23, № 1. – С. 5–15.
29. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* на фоне пандемии COVID-19: опыт многопрофильного стационара / Д. В. Тапальский [и др.] // *Инфекц. болезни: новости, мнения, обучение.* – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 15–22.
30. Evaluation of the therapeutic outcomes of antibiotic regimen against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis / C. Y. Effah [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 597907. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.597907>

## References

1. Eliopoulos G. M., Eliopoulos C. T. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clinical Microbiology Reviews*, 1988, vol. 1, no. 2, pp. 139–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139>
2. Tapalski D. V., Timoshkova E. V., Petrovskaya T. A., Osipkina O. V., Karpov I. A. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, vol. 23, no. 5, pp. 304–309. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>
3. Nelson R. E., Hatfield K. M., Wolford H., Samore M. H., Scott R. D., Reddy S. C., Olubajo B., Paul P., Jernigan J. A., Baggs J. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 29, no. 72, pp. 17–26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1581>
4. Zhu M., Tse M. W., Weller J., Chen J., Blainey P. C. The future of antibiotics begins with discovering new combinations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2021, vol. 1496, no. 1, pp. 82–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14649>
5. Ma J., Motsinger-Reif A. Current methods for quantifying drug synergism. *Protein Bioinformatics*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 43–48.

6. Vagner Kh., Ul'rikh-Mertsenikh G. Synergy research: creating a new generation of herbal medicines. *Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie* [Russian medical journal. Medical review], 2016, vol. 24, no. 3, pp. 183–189 (in Russian).
7. Frejre F. D., Kamara M. B., Dantas M. G., Soares Aragao S. F., de Lima i Moura T. F. A., Rafin F. N. Gastric-resistant isoniazid pellets reduced degradation of rifampicin in acidic medium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 50, no. 4, pp. 749–755. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400010>
8. Korol' L. A., Skatkov S. A. Iberogast – effective herbal medicine for functional diseases of the gastrointestinal tract. *Terapiya* [Therapy], 2016, no. 5, pp. 88–95 (in Russian).
9. Karakan T., Ozkul C., Küpeli Akkol E., Bilici S., Sobarzo-Sánchez E., Capasso R. Gut-brain-microbiota axis: antibiotics and functional gastrointestinal disorders. *Nutrients*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 389. <https://doi.org/10.3390/nu13020389>
10. Peng M., Han R., Guo Y., Zheng Y., Yang F., Xu X., Hu F. *In vitro* combined inhibitory activities of  $\beta$ -lactam antibiotics and clavulanic acid against blaKPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, 2021, vol. 2, no. 14, pp. 361–368. <https://doi.org/10.2147/IDR.S292612>
11. Tapal'skii D. V., Petrenev D. R., Khranchenkova O. M., Doroshkevich A. S. Antimicrobial and antifungal activity of lichen extracts common in Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology], 2017, no. 2, pp. 60–65 (in Russian).
12. Kononova L. I., P'yankov I. A., Smolyak A. A., Shklyayev Yu. V., Korobov V. P. Synergistic effect of the cationic peptide hominin and a new disinfectant based on isoquinoline on formation of biofilms in multidrug-resistant *Staphylococci*. *Antibiotiki i khimioterapiya* [Antibiotics and chemotherapy], 2020, vol. 65, no. 6, pp. 11–18 (in Russian).
13. Odds F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, vol. 52, no. 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
14. Tapal'skii D. V., Lagun L. V. *Methods for determining sensitivity to a combination of antibiotics, gram-negative bacteria with hypersensitivity and complete antibiotic resistance: indications for use*. Gomel, Gomel State Medical University, 2017. 27 p. (in Russian).
15. Aaron S., Ferris W., Henry D., Speert D., Macdonald N. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, vol. 161, no. 4, pp. 1206–1212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9907147>
16. Lang B., Aaron S., Ferris W., Hebert P., MacDonald N. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, vol. 162, no. 6, pp. 2241–2245. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.2005018>
17. Okoliegebe I. N., Hijazi K., Cooper K., Ironside C., Gould I. M. Antimicrobial synergy testing: comparing the tobramycin and ceftazidime gradient diffusion methodology used in assessing synergy in cystic fibrosis-derived multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 8, art. 967. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080967>
18. Fatsis-Kavalopoulos N., Roemhild R., Tang P.-C., Kreuger J., Andersson D. I. CombiANT: Antibiotic interaction testing made easy. *PLoS Biology*, 2020, vol. 18, no. 9, p. e3000856. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000856>
19. Kloezen W., Melchers R. J., Georgiou P.-C., Mouton J. W., Meletiadis J. Activity of cefepime in combination with the novel  $\beta$ -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133) against extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates in *in vitro* checkerboard assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, vol. 65, no. 4, p. e02338-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02338-20>
20. Tapal'skii D. V. Susceptibility to combinations of antibiotics of carbapenemase-producing nosocomial strains of gram-negative bacteria isolated in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy], 2018, vol. 20, no. 3, pp. 182–191 (in Russian).
21. Artyukh T. V., Sokolova T. N., Ostrovskaya O. B. Features of the resistance of clinical isolates of *E. coli* and *C. albicans* forming a biofilm. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of Vitebsk State Medical University], 2021, vol. 20, no. 1, pp. 46–54 (in Russian).
22. Adamovich T. G., Gavrilova I. A., Kiril'chik E. Yu. Methods for studying the antimicrobial activity of antibiotics and antiseptics *in vitro*. *Sovremennyye tekhnologii v meditsinskom obrazovanii: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu Belorusskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta (Minsk, 01–05 noyabrya 2021 goda)* [Modern technologies in medical education: materials of the international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Belarusian State Medical University (Minsk, November 01–05, 2021)]. Minsk, 2021, pp. 1540–1543 (in Russian).
23. Foerster S., Unemo M., Hathaway L. J., Low N., Althaus C. L. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiology*, 2016, vol. 16, art. 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>
24. Filimonova A. V., Golikova M. V., Strukova E. N., Portnoy Y. A., Kuznetsova A. A., Zinner S. H. Predicting the effects of carbapenem/carbapenemase inhibitor combinations against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-kill experiments: alternative versus traditional approaches to MIC determination. *Antibiotics (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 12, art. 1520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121520>
25. Chan E. L., Zabransky R. J. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas*. *Microbial Drug Resistance*, 1987, vol. 6, no. 2, pp. 157–164. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90101-5)

26. *Antimicrobial resistance surveillance in Central Asia and Europe, Annual report of the WHO Regional Office for Europe (2019)*. Available at: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf) (accessed 12.11.2021).

27. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W. S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 2020, vol. 81, no. 2, pp. 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05>

28. Sinopal'nikov A. I. COVID19 pandemic is a «pandemic» of antimicrobial therapy. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy], 2021, vol. 23, no. 1, pp. 5–15 (in Russian).

29. Tapal'skii D. V., Karpova E. V., Akulenok O. M., Okulich V. K., Generalov I. I., Leskova N. Yu. [et al.]. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the backdrop of the COVID-19 pandemic: experience of a multidisciplinary hospital. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious diseases: news, opinion, education], 2021, vol. 10, no. 3, pp. 15–22 (in Russian).

30. Effah C. Y., Drokow E. K., Agboyibor C., Liu S., Nuamah E., Sun T. [et al.]. Evaluation of the therapeutic outcomes of antibiotic regimen against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, vol. 12, art. 597907. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.597907>

### Информация об авторе

Артюх Татьяна Валерьевна – магистр мед. наук, ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com). <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>

### Information about the author

Tatiana V. Artyukh – Master of Medical Sciences, Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com). <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>