

©Borgis

*Aleksandra Garbusińska, Ewelina Szliszka

Aktywność leków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w kombinacjach wobec pałeczek Gram-ujemnych w badaniach *in vitro*

The activity of antimicrobial drugs used in combination against Gram-negative bacteria *in vitro*

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. med. Zenon Czuba, prof. nadzwyczajny SUM

Słowa kluczowe

pałeczki Gram-ujemne, mechanizmy lekooporności, synergizm, FICI, *time-kill*

Keywords

Gram-negative bacilli, mechanisms of drug resistance, synergism, FICI, time-kill

Konflikt interesów Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

Adres/address:

*Aleksandra Garbusińska
Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Wydział Lekarski z Oddziałem
Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
tel. +48 (32) 272-25-54
fax +48 (32) 272-25-54
aleksandra.garbusinska@io.gliwice.pl

Streszczenie

Zakażenia wywołane przez bakterie odporne na leki przeciwdrobnoustrojowe są poważnym problemem terapeutycznym. W takich sytuacjach powszechnie stosowane schematy leczenia nie pozwalają na uzyskanie pozytywnego efektu klinicznego. Szczepy ze szczególnie niebezpiecznymi mechanizmami lekooporności występują w grupie pałeczek Gram-ujemnych należących do rodziny *Enterobacteriaceae* (najczęściej gatunków z rodzajów *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*) oraz pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących (ang. *non-fermentive Gram-negative bacilli* – NFGNB). W ciężkich infekcjach stosowana jest antybiotykoterapia zgodnie z przyjętymi rekomendacjami, ale mechanizmy lekooporności nabywane są przez bakterie niezwykle szybko, stąd też schematy leczenia z użyciem leków o szerokim spektrum, często należących do grupy „leków ratunkowych”, mogą być nieskuteczne. Alternatywną opcją terapeutyczną jest leczenie skojarzone polegające na podawaniu pacjentowi zwykle dwóch lub trzech chemioterapeutyków równocześnie w celu osiągnięcia efektu synergii leków, czyli spotęgowania działania mikrobójczego.

Obecnie przeprowadzane są badania laboratoryjne służące do oceny efektywności przeciwbakteryjnej leków zastosowanych w skojarzeniach. Jedną z metod jest obliczanie wskaźnika FICI (ang. *fractional inhibitory concentration index*), który przedstawia zależność wartości MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) dla każdego leku użytego osobno wobec wartości MIC dla leków użytych w kombinacji. Uzyskane wartości wskaźnika FICI interpretowane są według zdefiniowanych wartości synergizmu, antagonizmu, addycji i obojętności. W innej metodzie – *time-kill* – zawiesina szczepu bakteryjnego eksponowana jest na wybrane stężenia leków użytych osobno oraz w kombinacji. Analizie podlega przeżywalność komórek w wybranych odstępach czasowych poprzez zliczanie tych, które przeżyły. Poziomy redukcji liczebności komórek bakterii prezentowane na wykresach, interpretowane są według zdefiniowanych wartości synergizmu, antagonizmu, addycji i obojętności.

Publikowane wyniki badań są optymistyczne, ponieważ wskazują na występowanie przypadków spotęgowanego działania leków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w skojarzeniach wobec lekoopornych pałeczek Gram-ujemnych. Analiza synergizmu leków przeciwdrobnoustrojowych wymaga dalszego pogłębienia rozwoju tego typu badań, które wykonywane w warunkach *in vitro* powinny być potwierdzane testem klinicznym.

Summary

Infections caused by bacteria resistant to antimicrobial drugs is a major therapeutic problem. In such situations commonly used treatment regimens cannot achieve positive clinical effect. Strains of drug-resistant mechanisms of high-risk group are present in Gram-negative bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family (e.g. *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*) and non-fermentative Gram-negative (non-fermentive Gram-negative bacilli – NFGNB).

In severe infections, antibiotic therapy is applied in accordance with the accepted recommendations, but the mechanisms of drug resistance acquired by the bacteria very quickly, the schemes of treatment with a broad spectrum of drugs, is often in the group of “rescue therapy” may be ineffective. An alternative option is a therapeutic combination treatment comprising administering to the patient usually two or three chemotherapeutic

agents simultaneously in order to achieve a synergy effect of drugs, which is intensified by an antimicrobial action. Currently we carried out laboratory tests for assessing the effectiveness of antimicrobial drugs used in the associations. One method is to calculate the ratio FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index), which shows the dependence of the MIC values for each drug used separately against the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) values for drugs used in combination. The obtained value of the index FICI interpreted according to the defined values of synergism, antagonism, addition and indifference.

The another method – time-kill, a suspension of the bacterial strain is exposed to selected concentrations of drugs used alone and in combination. The subjects to analysis are the viability of cells in the selected time intervals by counting the number of survivors. The levels of reducing the number of bacteria cells presented in charts, are interpreted according to the defined values of synergism, antagonism, addition and indifference.

The published studies are optimistic because they indicate the incidence of heightened activity of antimicrobial agents used in the associations against drug-resistant Gram-negative bacteria. Recognizing the problem the synergistic antimicrobial drugs requires the development of this type of research to be performed *in vitro* should be confirmed of clinical examination.

WPROWADZENIE

Zakażenia związane z opieką zdrowotną HAI (ang. *healthcare associated infection*) są często wywoływane przez lekooporne bakterie. Jest to poważny problem terapeutyczny, ponieważ w takich sytuacjach powszechnie stosowane schematy leczenia nie pozwalają na uzyskanie pozytywnego efektu klinicznego. Antybiotyki „ratunkowe” rekomendowane do leczenia tych infekcji mogą bowiem okazać się nieskuteczne z powodu szybkiego nabywania przez bakterie cech lekooporności. Rozwiązaniem jest wprowadzanie do użycia coraz nowszych generacji leków przeciwdrobnoustrojowych, na które bakterie jeszcze nie zdążyły wytworzyć mechanizmu oporności. Alternatywną strategią może być również antybiotykoterapia z zastosowaniem kombinacji leków.

LEKOOPORNOŚĆ PAŁECZEK GRAM-UJEMNYCH

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zakażeń wywoływanych przez pałeczki Gram-ujemne należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, reprezentowanej najczęściej przez gatunki z rodzajów: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* oraz pałeczki nie-*Enterobacteriaceae* określane również jako bakterie niefermentujące (ang. *non-fermentive Gram-negative bacilli* – NFGNB), do których należą rodzaje: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* (1, 2). Powyższe grupy bakterii odznaczają się wysoką odpornością na bodźce stresowe, stąd też szybko kolonizują środowisko szpitalne. Drobnoustroje preferują miejsca wilgotne i rozprzestrzeniają się, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia pacjenta. Oporność na środki dezynfekcyjne, obserwowana zwłaszcza wśród szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, czy też zdolność pałeczek do tworzenia biofilmów znacznie utrudnia ich eradykację ze środowiska.

Umiejętność przeżycia w trudnych warunkach jest uwarunkowana strukturą komórki bakteryjnej. Pałeczki Gram-ujemne posiadają w ścianie komórkowej błonę zewnętrzną z licznymi białkami OMP (ang. *outer membrane proteins*). Błona ta stanowi doskonałą barierę chroniącą komórkę przed wnikaniem substancji chemicznych, w tym leków. Bakterie Gram-ujemne,

a w szczególności *Acinetobacter* spp., mogą kolonizować również skórę i błony śluzowe pacjentów. Prawdopodobieństwo zakażenia egzogenne w środowisku szpitalnym jest więc wysokie, zwłaszcza u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, czyli z obniżoną odpornością, leczonych przewlekle, poddawanych zabiegom z naruszeniem ciągłości tkanek (3-5).

Leczenie zakażeń wywoływanych przez pałeczki Gram-ujemne jest niejednokrotnie trudne z powodu narastającej oporności szczepów na szereg grup antybiotyków. Z uwagi na zróżnicowany zakres lekooporności, dokonano podziału szczepów bakterii na: wielolekooporne MDR (ang. *multidrug-resistant*), o rozszerzonej oporności XDR (ang. *extensively drug-resistant*) oraz całkowitej oporności na antybiotyki PDR (ang. *pandrug resistant*) (3, 6-8).

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2011 roku (Dz. U. z 2011, nr 294, poz. 1741) określa listę czynników alarmowych, do których zalicza się drobnoustroje z najbardziej niebezpiecznymi mechanizmami lekooporności (9). W wykazie wyszczególnione są między innymi następujące pałeczki Gram-ujemne:

- pałeczki Gram-ujemne *Enterobacteriaceae* wytwarzające beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, takie jak: ESBL (ang. *extended-spectrum β -lactamases*), AmpC (ang. *AmpC- β -lactamases*), KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*) odporne na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub polimyksyny,
- pałeczkę ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) oporną na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub polimyksyny,
- pałeczki niefermentujące *Acinetobacter* spp. odporne na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub polimyksyny.

Wyizolowanie od pacjentów patogenu alarmowego wymaga rejestracji, potwierdzenia w ośrodku referencyjnym i podjęcia odpowiednich działań ze strony Zespołu do spraw zakażeń szpitalnych w celu wdrożenia wzmożonego reżimu sanitarnego, a także powiadomienia inspekcji sanitarnej (1, 8).

Uwarunkowane genetycznie mechanizmy lekooporności komórka bakteryjna nabywa nadzwyczaj szybko,

ponieważ przenoszenie genów z komórki do komórki odbywa się nie tylko wraz z podziałami komórkowymi, lecz także niezależnie od nich, za sprawą ruchomych elementów genetycznych, takich jak: plazmidy, kasety, transpozony. Transfer może odbywać się pomiędzy komórkami należącymi do tego samego gatunku lub też z pominięciem bariery gatunkowej, pomiędzy komórkami różnych gatunków, jako transfer horyzontalny (4, 7, 8).

Bakterie wytwarzają zróżnicowane mechanizmy lekooporności. Jednym z nich jest zaburzona przepuszczalność struktury powierzchniowej komórki skutkująca ograniczeniem bądź utratą zdolności transportowania leku do wnętrza komórki bakteryjnej. Transport antybiotyków warunkują kanały porynowe obecne w błonie zewnętrznej. W fazie intensywnego wzrostu komórki poryny odznaczają się szczególną przepuszczalnością, przez co i siła działania leków jest wysoka. W fazie stacjonarnej natomiast siła działania obniża się, ponieważ poryny tracą przepuszczalność. Nienaruszona struktura kanałów warunkuje wnikanie antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej i jej zniszczenie. Mogą jednak wystąpić mutacje genów odpowiedzialnych za ekspresję poryn powodujące redukcję ich liczby (3, 4, 7, 10-13).

Inny mechanizm lekooporności jest związany z wyrzutem leków z komórki bakteryjnej poprzez aktywny, sprawnie działający system pomp *efflux*. Nadekspresja białek transportowych tego systemu powoduje wzmożony wyrzut leków poza komórkę bakteryjną (7, 10). Szczepy bakterii posiadają pompy o zróżnicowanej strukturze, charakteryzujące się określonym powinowactwem substratowym. Na przykład lekooporne szczepy *P. aeruginosa* posiadają pompę oznakowaną symbolem MexAB-OprM, która jest odpowiedzialna za wyrzut leków, takich jak: meropenem, fluorochinolony, penicyliny, cefalosporyny (10). *Pseudomonas aeruginosa* posiada ponadto pompy MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM usuwające z komórki inne leki, np. tetracykliny, chloramfenikol, antybiotyki β -laktamowe, chinolony (10, 14). Innym przykładem są szczepy *E. coli* posiadające pompy o symbolach: 7ABC, 19 MFS, 1 MATE, 5 SMR, 7RND, AcrAB-Tolc, których nadekspresja skutkuje pojawieniem się oporności na fluorochinolony, antybiotyki β -laktamowe, tetracykliny (14).

Antybiotyki β -laktamowe celują w białka enzymatyczne PBP (ang. *penicillin binding proteins*) komórki, które są odpowiedzialne za syntezę ściany komórkowej. Komórka bakteryjna bez ściany lub z uszkodzoną ścianą komórkową ulega lizie. Mechanizmem obronnym bakterii jest unieczynnienie antybiotyków poprzez ich rozkład z udziałem enzymów β -laktamaz. Jest to szeroka grupa enzymów odpowiednio sklasyfikowanych, a ich lista nie jest zamknięta, ponieważ wciąż odkrywano kolejne. Produkcja tych enzymów jest uwarunkowana mutacjami chromosomalnymi lub przekazem genów plazmidowych. Przykładem β -laktamaz są produkowane przez *Acinetobacter* spp.: OXA-23, OXA-24, OXA-58, IMP, VIM MBLs (7). Wspomniane wcześniej mechanizmy lekooporności: ESBL, AmpC,

KPC czy też MBL (ang. *metallo- β -lactamases*) wytwarzają najbardziej niebezpieczne szczepy bakterii (1, 2). Szczepy pałeczek ESBL produkują enzymy o spektrum substratowym obejmującym penicyliny (bez ich połączeń z inhibitorami), cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn), monobaktamy. Szczepy z mechanizmem AmpC hydrolizują penicyliny włącznie z ich połączeniami z inhibitorami, większość cefalosporyn i monobaktamy. Szczepy z mechanizmem MBL inaktywują również karbapenemy. Do najbardziej niebezpiecznych należą obecnie szczepy KPC rozkładające wszystkie antybiotyki β -laktamowe, włącznie z karbapenemami (1, 2, 7, 15). Mechanizm ten jest najczęściej wykrywany u pałeczek: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *C. freundii*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *P. putida* i wiąże się często z opornością na inne grupy antybiotyków. Ratunkiem dla pacjenta może być terapia skojarzona, z użyciem kolistyny, tigecykliny, gentamicyny lub amikacyny. Szczepy *K. pneumoniae* – klon ST258 KPC⁺ – określane jako „hiperepidemiczne”, są izolowane również w Polsce.

SCHEMATY SKOJARZONEGO LECZENIA PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO STOSOWANE KLINICZNIE W ZAKAŻENIACH LEKOOPORNYMI PAŁECZKAMI GRAM-UJEMNYMI

W leczeniu trudnych zakażeń stosuje się w pierwszej kolejności antybiotykoterapię empiryczną, która skierowana jest wobec najbardziej prawdopodobnego czynnika chorobotwórczego. Lekarze, wybierając schemat leczenia, opierają się na raportach epidemiologicznych szpitala, rekomendacjach naukowych, piśmiennictwie oraz własnych doświadczeniach klinicznych. Leczenie empiryczne, polegające na włączeniu antybiotyków o szerokim zakresie mikrobójczego działania, zawsze powinno być zweryfikowane wynikiem badania mikrobiologicznego i zastąpione leczeniem celowanym lekami o zawężonym zakresie mikrobójczym. Leki przeciwbakteryjne o bardzo szerokim zakresie, tzw. ratunkowe, należy zarezerwować wyłącznie do leczenia szczególnie trudnych i niebezpiecznych zakażeń. Respektowanie tej zasady ma na celu zapobieganie szerzeniu się lekooporności. Bakterie jednak, dzięki zdolnościom bardzo szybkiego nabywania coraz to nowszych mechanizmów, uodporniają się z czasem również i na te antybiotyki. W takich przypadkach zwykle poszukuje się innych rozwiązań. Alternatywną opcją terapeutyczną może okazać się leczenie skojarzone polegające na podawaniu pacjentowi zwykle dwóch lub trzech chemioterapeutyków równocześnie, w celu osiągnięcia efektu synergii leków, czyli spotęgowanego działania mikrobójczego. To postępowanie posiada jeszcze inne, dodatkowe zalety, mianowicie zapewnia maksymalizację efektów leczenia przy zminimalizowanym ryzyku powstania lekooporności i zezwala na aplikowanie pacjentowi niższych dawek leków (16).

W tabeli 1 przedstawiono przykłady zastosowanych schematów antybiotykoterapii, w wyniku których odnotowano pozytywny efekt terapeutyczny.

Tab. 1. Przykłady stosowanych schematów skojarzonego leczenia przeciwdrobnoustrojowego

Czynnik etiologiczny zakażenia	Schematy leczenia skojarzonego	Piśmienictwo
<i>A. baumannii</i>	po dwa leki w różnych połączeniach spośród leków: tigeicyklina, polimiksyna, erytromycyna, amikacyna, imipenem	(6)
<i>A. baumannii</i>	kolistyna + rifampicyna lub meropenem lub minocyklina, minocyklina + meropenem	(4)
<i>P. aeruginosa</i>	kolistyna + rifampicyna lub imipenem lub meropenem lub piperacylina lub ceftazydim lub ciprofloksacyna	(17)
Szczypty wzorcowe pałeczek Gram-ujemnych z kolekcji NCTC: <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	kolistyna + telavancin	(12)
<i>P. aeruginosa</i>	aminoglikozyd + lek β-laktamowy lub lek z grupy fluorochinolonów	(18)
<i>P. aeruginosa</i>	lek z grupy aminoglikozydów + lek z grupy β-laktamów tikarcylina z kwasem klawulanowym + tobramycyna lub rifampicyna	(19)
<i>S. maltophilia</i>	tikarcylina z kwasem klawulanowym + aztreonam lub kotrimoksazol	(19)
<i>A. baumannii</i>	kolistyna + lek z grupy karbapenemów lub rifampicyna	(19)
<i>A. baumannii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	tigeicyklina + kolistyna lub meropenem lub amikacyna lub ciprofloksacyna	(20)
<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. xylosoxidans</i>	polimiksyna B + imipenem lub amikacyna lub tobramycyna lub cefepim lub ampicylina z sulbactamem	(21)

METODY BADANIA *IN VITRO* AKTYWNOŚCI LEKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH W SKOJARZENIACH

Wyznaczanie współczynnika FICI/FIC index

W badaniach stosowana jest metoda obliczania tzw. współczynnika FIC index, inaczej FICI (ang. *fractional inhibitory concentration index*) (6, 18, 22-25). Uzyskane wyniki interpretuje się według zdefiniowanych wartości synergizmu, antagonizmu, addycji czy obojętności (ryc. 1).

FICI ≤ 0,5 to synergizm
0,5 < FICI ≤ 1 to addycja
1 < FICI ≤ 4 to obojętność
FICI > 4 to antagonizm

Synergizm – spotęgowanie skuteczności zastosowanych leków
Addycja – zsumowanie efektów zastosowanych leków
Obojętność – brak efektu zastosowanych leków
Antagonizm – skojarzone działanie leków jest mniej skuteczne niż działanie jednego z leków, bardziej aktywnego, podanego oddzielnie

Ryc. 1. Interpretacja wartości FICI dla dwóch leków zastosowanych w skojarzeniu

W publikacjach pojawiają się również odstępstwa od interpretacji przedstawionej na rycinie 1: antagonizm występuje, gdy wartość FICI > 2, obojętność, gdy wartość FICI = 2 (24) lub 0,5 ≤ FICI < 4, a synergizm – tylko przy wartości FICI niższej niż 0,5 (25).

Badanie przeprowadza się dwuetapowo. Na wstępie oznacza się wartości MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) dla każdego leku użytego osobno, a w drugim etapie również wartość MIC dla leków użytych w połączeniach (dwa lub trzy leki). Wyznaczanie wartości MIC przeprowadza się najczęściej metodą mikrorozcieńczeniową z zastosowaniem 96-studienkowych płytek mikrotitrowych, inokulując w nich zawiesiny szczepu bakterii o odpowiedniej, stałej gęstości i objętości. Zawiesinę poddaje się ekspozycji na antybiotyk/antybiotyki w podwójnych rozcieńczeniach. W badaniach przygotowywane są stężenia leków, które można odnieść do stężeń leków osiągalnych w płynach ustrojowych. Nie wykonuje się badań lekooporności z użyciem zbyt wysokich lub zbyt niskich stężeń, ponieważ uzyskane wyniki nie mają zastosowania klinicznego (23). Inkubację hodowli przeprowadza w czasie od 16 do 24 godzin. Współczynniki FICI są obliczane według wzorów przedstawionych na rycinie 2.

FICI dla dwóch leków zastosowanych w kombinacji wynosi:

$$FIC_x = \frac{MIC_{xc}}{MIC_x} \quad FIC_y = \frac{MIC_{yc}}{MIC_y}$$

FICI dla dwóch leków zastosowanych w kombinacji wynosi odpowiednio:

$$FICI = FIC_x + FIC_y \quad (\text{czyli: } \frac{MIC_{xc}}{MIC_x} + \frac{MIC_{yc}}{MIC_y})$$

MIC_x, MIC_y są wartościami MIC leków: X, Y użytych osobno
MIC_{xc}, MIC_{yc} są wartościami MIC leków: X, Y w kombinacji

Ryc. 2. Obliczanie współczynników FICI dla dwóch leków zastosowanych w kombinacji

Wyznaczanie krzywych przeżywalności (zabicia) *time-kill*

Zawiesinę szczepu bakteryjnego ekspozuje się na wybrane stężenia leków przeciwdrobnoustrojowych użytych osobno oraz w połączeniach, zwykle w dawkach poniżej wartości MIC (26, 27). Następnie obserwuje się przeżywalność komórek w wybranych odstępach czasowych poprzez zliczanie komórek bakterii, które nie zostały zabite. Poziom redukcji liczebności komórek bakterii określa się w stopniach logarytmicznych (log₁₀), a uzyskane wyniki prezentowane są na wykresach – krzywych zabicia *time-kill*. Tym sposobem dokonuje się porównań aktywności antybiotyków użytych osobno bądź w skojarzeniach wobec konkretnego szczepu bakterii.

Wystąpienie zjawiska synergii interpretuje się w sposób zróżnicowany:

- jako wzrost redukcji liczebności komórek bakterii w przypadku kombinacji leków o ≥ 2 log₁₀ (wyrażoną w CFU/ml) w porównaniu z bardziej aktywnym lekiem wchodzącym w skład zastosowanej kombinacji. Inkubację przeprowadza się w czasie od 6 do 24 godzin (6, 11, 22, 24-29),

- jako wzrost redukcji liczebności komórek bakterii o min. 3 log₁₀ (wyrażona w CFU/ml) w wyniku zastosowania kombinacji leków, w porównaniu z monoterapią (12, 26).

Wystąpienie zjawiska obojętności jest definiowane jako:

- wzrost redukcji liczebności komórek bakterii o ± 1 log₁₀ w przypadku kombinacji leków, w porównaniu z redukcją tej liczebności spowodowaną działaniem najbardziej skutecznego leku w tym połączeniu, użytego osobno, w czasie 24 godzin (27),
- zwiększanie bądź zmniejszanie liczby kolonii o < 2 log₁₀ w przypadku zastosowania kombinacji leków w porównaniu z bardziej aktywnym lekiem (29).

Z kolei antagonizm występuje w warunkach:

- zahamowania redukcji liczebności komórek bakterii o < 2 log₁₀ 100-krotnie – w przypadku kombinacji leków, w porównaniu z najbardziej skutecznym lekiem działającym osobno w czasie 24 godzin (27),
- wzrostu o minimum 2 log₁₀ liczby komórek bakterii w przypadku zastosowania kombinacji leków w porównaniu z bardziej skutecznym lekiem (29).

W tabeli 2 przedstawiono przykłady wyników badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej leków stosowanych w skojarzeniach, przeprowadzonych metodą wyznaczania współczynnika FICI oraz metodą *time-kill*.

Badania *in vivo*

W badaniach Louie i wsp. (28) użyto szczep *Pseudomonas aeruginosa*, którym zainfekowano donosowo płuca myszy, a następnie wdrożono monoterapię. Antybiotykiem z wyboru była tobramycyna lub meropenem zastosowane w różnych dawkach. Przeprowa-

dzano także leczenie skojarzone z użyciem meropenemu w połączeniu z tobramycyną w różnych dawkach. Wstępnie myszy uśmiercano, a pobraną tkankę płuc po odpowiednim przygotowaniu posiewano na podłoża hodowlane. Badanie miało na celu porównanie skuteczności monoterapii i terapii skojarzonej. Wyniki wskazywały na istnienie synergii w schemacie leczenia z użyciem kombinacji meropenemu z tobramycyną.

PODSUMOWANIE

W leczeniu pacjentów z infekcjami bakteryjnymi niezbędna jest optymalizacja działań zmierzających do uzyskania pożądanego efektu klinicznego. Problemem są zakażenia wieloopornymi szczepami bakterii. Stosowanie zalecanych w rekomendacjach schematów może okazać się nieskuteczne z powodu pojawiania się nowych mechanizmów lekooporności. W takich przypadkach cenną opcją terapeutyczną wydaje się leczenie skojarzone. Obecnie przeprowadzane są badania laboratoryjne służące analizie mechanizmów oddziaływania leków na komórkę bakteryjną zastosowanych w kombinacjach. Do oceny efektywności przeciwbakteryjnej leków zastosowanych w skojarzeniach używa się metody wyznaczania wskaźnika FICI oraz metodę *time-kill*. Wyniki tych badań są optymistyczne, jednakże powinny one być potwierdzone również dalszymi badaniami oraz testami klinicznymi w powiązaniu z efektami farmakodynamicznymi leków. Interpretacja spotęgowanego działania skojarzonych leków w oparciu o molekularne mechanizmy lekooporności nie jest jeszcze jednoznacznie określona. Rozwój badań ukierunkowanych na kompleksowe rozpoznanie problemu synergizmu leków przeciwdrobnoustrojowych wydaje się sprawą priorytetową.

Tab. 2. Przykłady synergizmu leków przeciwbakteryjnych wykrytych w badaniach *in vitro*

Czynniki etiologiczne zakażeń	Przykłady synergizmu leków przeciwbakteryjnych	Piśmienictwo
<i>Burkholderia cepacia</i> , szczepy kliniczne, wielooporne	FICI – efekt synergizmu badano dla 23 połączeń antybiotyków z puli 18 leków. Najsilniejszy efekt stwierdzono dla następujących kombinacji: ceftazydym + chloramfenikol (10% badanych przypadków) ceftazydym + amikacyna (15% badanych przypadków) ceftazydym + tobramycyna (12% badanych przypadków) piperacylina + ciprofloksacyna (10% badanych przypadków)	(23)
<i>Acinetobacter baumannii</i> , szczepy kliniczne, wielooporne	<i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: cefepim + amikacyna lub lewofloksacyna	(30)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL, <i>Enterobacter cloacae</i> AmpC, <i>Escherichia coli</i> ESBL i inne szczepy	<i>time-kill</i> – silny synergizm dla połączeń: ceftarolina + amikacyna lub tazobactam lub meropenem lub aztreonam	(31)
<i>Acinetobacter baumannii</i> , szczepy kliniczne, wielooporne	FICI – synergizm dla połączeń: polimyksyna B + rifampicyna (19% badanych przypadków) polimyksyna B + tigecyklina (12% badanych przypadków) tigecyklina + rifampicyna (19% badanych przypadków) E-test – synergizm dla połączenia: polimyksyna B + rifampicyna (6% badanych przypadków) <i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: polimyksyna B + rifampicyna (56% badanych przypadków) polimyksyna B + tigecyklina (44% badanych przypadków) tigecyklina + rifampicyna (19% badanych przypadków)	(22)

Tab. 2. C.D.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne, wielooporne	<i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: polimiksylna B + doripenem + rifampicylna polimiksylna B + doripenem lub rifampicylna doripenem + rifampicylna	(27)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne, wielooporne oraz bez mechanizmów wielooporności	FICI – synergizm dla połączeń: ceftazydym + tobramycyna (od 31 do 67% badanych przypadków) piperacylina/tazobactam + tobramycyna (od 46 do 50% badanych przypadków) W znacznie mniejszej liczbie badanych przypadków stwierdzono synergizm dla połączeń: imipenem + tobramycyna lub ciprofloksacyna lub isepamycyn Nie stwierdzono istotnych różnic w uzyskaniu efektu synergii w przypadku szczepów wieloopornych i wrażliwych na leki	(18)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczep dziki oraz mutant z nadekspresją <i>efflux – pump MexAB</i>	<i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: meropenem + lewofloksacyna, w schematach z użyciem zróżnicowanych dawek leków	(26)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy wzorcowe i kliniczne	FICI, <i>time kill</i> – synergizm dla połączeń: sulfametaksazol + związek fitochemikalny (kwas galicidowy/kwas elaginowy/kwas protokatechinowy) tetracyklina + kwas galicidowy	(11)
<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR, szczep kliniczny	E-test – synergizm dla połączeń: imipenem + kolistyna (dla 100% szczepów) imipenem + tigecyklina (dla ok. 50% szczepów) FICI, <i>time-kill</i> – synergizm wystąpił sporadycznie	(6)
<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FICI – synergizm dla połączenia: telavancin + kolistyna (dla szczepów <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. maltophilia</i>) <i>time-kill</i> – synergizm dla połączenia: telavancin + kolistyna (dla szczepów: <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>) E-test – synergizm dla połączenia: telavancin + kolistyna (dla <i>A. baumannii</i>)	(12)
<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	FICI, E-test, <i>time-kill</i> – synergizm dla połączenia: teikoplanina + kolistyna, dla wszystkich badanych szczepów	(32)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy wielooporne, kliniczne	FICI – synergizm najczęściej dla połączeń: ceftazydym + amikacyna lub ciprofloksacyna ciprofloksacyna + piperacylina lub tazobactam	(33)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne oraz szczep wzorcowy	FICI – synergizm dla połączenia sulfametaksazol + preparat chitozanu (pochodna chityny) dla 5 preparatów chitozanu lub jego pochodnych: chitozan oligo, LMW, MMW, MMW(d), HMW	(34)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne, wielooporne	FICI, E-test, <i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: ceftazydym + tobramycyna meropenem + tobramycyna	(35)
<i>Acinetobacter baumannii</i> XDR-AB, szczepy odporne na chloramfenikol, wrażliwe na kolistynę	FICI – synergizm dla połączenia: kolistyna + chloramfenikol (dla 16 szczepów z 50 badanych) <i>time-kill</i> – synergizm dla połączenia: kolistyna + chloramfenikol (dla wszystkich 4 badanych szczepów)	(24)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne, odporne na imipenem	FICI – synergizm dla połączenia: syntetyczny, cykliczny lipopeptyd AMP38 + imipenem (dla wszystkich 4 badanych szczepów)	(25)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczepy kliniczne, odporne na karbapenemy	<i>time-kill</i> – najsilniejszy efekt synergizmu w testowaniu 4 leków w różnych połączeniach: kolistyna + meropenem (dla 12 szczepów z 28 badanych) meropenem + amikacyna (dla 10 szczepów z 28 badanych)	(29)
<i>Acinetobacter baumannii</i> , szczepy kliniczne, lekooporne	<i>time-kill</i> – synergizm dla połączeń: fosfomycyna + amikacyna kolistyna + rifampicylna	(29)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , szczepy kliniczne, lekooporne	<i>time-kill</i> – synergizm dla 2 połączeń: polimiksylna B + amikacyna lub imipenem lub tigecyklina <i>time-kill</i> – synergizm dla 3 połączeń: polimiksylna B + tigecyklina + amikacyna lub meropenem lub imipenem polimiksylna B + amikacyna + imipenem lub meropenem	(29)

PIŚMIENNICTWO

- Hryniewicz W: Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku identyfikacji w zakładach opieki zdrowotnej szczepów bakteryjnych *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy typu KPC – 2010. Zalecenia Ministerstwa Zdrowia w ramach NPOA, Warszawa 2010.
- Gniadkowski M, Zabicka D, Hryniewicz W: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii a antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gam-ujemnych. KORLD, Warszawa 2009.
- Manhanda V, Sanchaita S, Singh NP: Multidrug resistant *Acinetobacter*. J Glob Infect Dis 2010; 3: 291-304.
- Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J: The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol 2012; 3: 148.
- Lanini S, D'Arezzo S, Puro V et al.: Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. PLoS One 2011; 6: e17064.

6. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA et al.: Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4678-4683.
7. Souli M, Galani J, Giamarellou H: Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*. 2008; 47: 1-11.
8. Hryniewicz W: Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywoływanych przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zalecenia Ministerstwa Zdrowia w ramach NPOA, Warszawa 2012.
9. Rozporządzenie Ministerstwa Zdrowia z 23.12.2011 r. (Dz. U. 2011, nr 294, poz. 1741) w sprawie listy czynników alarmowych, rejestru zakażeń szpitalnych i czynników alarmowych oraz raportów o bieżącej sytuacji epidemiologicznej szpitala.
10. Rahal JJ: Antimicrobial resistance among and therapeutic options against Gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 2009; 49: S4-S10.
11. Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS et al.: Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 556-568.
12. Homsey M, Longshaw Ch, Phee L, Wareham DW: *In vitro* activity of telavancin in combination with colistin versus Gram-negative bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3080-3085.
13. Veiga-Crespo P, Fuste E, Vinuesa T et al.: Synergism between outer membrane proteins and antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2206-2211.
14. Wasążnik A, Grinholc M, Bielawski KP: Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania. *Postępy Hig Med Dośw* 2009; 63: 123-133.
15. Gniadkowski M: Materiały XV Sympozjum Naukowego: Postępy w medycynie zakażeń. Karbapenemazy typu KPC. Warszawa 2011.
16. Paterson DL: Impact of antibiotic resistance in Gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2008; 47: S14-S-20.
17. El Solh AA, Alhajhusain A: Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chem* 2009; 64: 229-238.
18. Dundar D, Otkun M: *In vitro* efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Yonsei Med J* 2010; 51: 111-116.
19. Hryniewicz W, Ozorowski T: Szpitalna lista antybiotyków. Zalecenia Ministerstwa Zdrowia w ramach NPOA. Warszawa 2011.
20. Bassetti M, Nicolini L, Rapetto E et al.: Tigecycline use in serious nosocomial infections: a drug use evaluation. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 287.
21. Sobieszczyk ME, Furuya EY, Hay ChM et al.: Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 566-569.
22. Tan TY, Lim TP, Ling WH et al.: *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by *time-kill*, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 436-438.
23. Zhou J, Chen Y, Tabibi S: Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1085-1088.
24. Wen WJ, Yang HF: Synergy against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii in vitro* by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49: 321-326.
25. Rudilla H, Fusté E, Cajal Y et al.: Synergistic antipseudomonal effects of synthetic peptide AMP38 and carbapenems. *Molecules* 2016; 21: 1223.
26. Louie A, Grasso C, Bahniuk N et al.: The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2646-2654.
27. Urban C, Mariano N, Rahal JJ: *In vitro* double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2732-2734.
28. Louie A, Liu W, Fikes S et al.: Impact of meropenem in combination with tobramycin in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2788-2792.
29. Leite GC, Neto LVP, Gaudereto JJ et al.: Effect of antibiotics combination and comparison of methods for detection of synergism in multiresistant Gram-negative bacteria. *J Infect Dis Ther* 2015; 3: 207.
30. Lim T-P, Ledesma KR, Chang K-T et al.: Quantitative assessment of combination therapy against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2898-2904.
31. Vidailac C, Leonard SN, Sader HS et al.: *In vitro* activity of ceftaroline alone and in combination against clinical isolates of resistant Gram-negative pathogens, including β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2360-2366.
32. Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M: *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1047-1051.
33. Milne KEN, Gould IM: Combination testing of multidrug-resistant cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: use a new parameter, the susceptible breakpoint index. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 82-90.
34. Tin S, Sakharkar KR, Lim ChS, Sakharkar MK: Activity of chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Sci* 2009; 5: 153-160.
35. Segura C, Plasencia V, Ventura E et al.: *In vitro* activity of ceftazidime and meropenem in combination with tobramycin or ciprofloxacin in a clone of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Res* 2013; 3: 99-105.

otrzymano/received: 12.07.2017
zaakceptowano/accepted: 31.07.2017