

УДК 579:845:616-002.3

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ  
АКТИВНОСТІ КОМБІНАЦІЙ ФОСФОМІЦИНУ  
З ЦЕФЕПІМОМ ТА ФОСФОМІЦИНУ З  
ТІЕНАМОМ ЩОДО  
ПОЛІАНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНИХ  
ШТАМІВ СИНЬОГНІЙНОЇ ПАЛИЧКИ**

**Дяченко В.Ф., Ягнюк Ю.А., Марющенко А.М.,  
Куцай Н.М.**

**ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.  
Мечникова НАМН України”**

Проведене експериментальне дослідження методом «шахової дошки» ефективності комбінації антибіотиків фосфоміцину з цефепімом та фосфоміцину з тіенамом по відношенню до 13 полірезистентних штамів синьогнійної палички. Встановлено, що відносна кількість поліантibiотикорезистентних штамів, на яких зафіксована синергідна дія комбінації фосфоміцину з цефепімом (69,23±13,32%), вірогідно перевищувала зазначений показник при комбінації фосфоміцину з тіенамом.

**Ключові слова:** комбінації антибіотиків, поліантibiотикорезистентні штами, метод “шахової дошки”.

Стрімке зниження чутливості збудників гнійно-септичних інфекцій до протимікробних засобів призвело до значних труднощів в боротьбі з антибіотикорезистентними інфекціями навіть в економічно розвинутих країнах. За даними ВООЗ, в загальній структурі смертності кількість летальних випадків у зв'язку з інфекційними ускладненнями складає в різних країнах від 42 до 60%, тільки в Західній Європі щорічно помирає 500 тис. хворих від важких форм інфекції, а в США щорічно від метицилінрезистентних стафілококових інфекцій (MRSA) помирає більше пацієнтів, ніж від СНІДу та туберкульозу разом взятих [1, 2, 3]. В Україні у загальній структурі смертності також різко зростає кількість летальних випадків у зв'язку з неефективністю антибіотикотерапії, особливо при лікуванні синьогнійної інфекції [4, 5].

В зв'язку з тим, що найближчим часом поява нових антибіотиків малоімовірна, доцільно покладатись на більш раціональне та науково обгрунтоване використання вже існуючих антибіотиків, в тому числі - комбінування препаратів різних груп [6, 7]. Найбільш перспективними для комбінування, як свідчать результати закордонних досліджень, є препарати з похідних фосфонові кислоти, які здатні глибоко проникати в біологічні плівки і мікробні клітини та посилювати антибактеріальну дію інших протимікробних засобів [8, 9, 10].

**Мета дослідження**

Визначення ефективності дії комбінації антибіотиків фосфоміцину з цефепімом та фосфоміцину з тіенамом на поліантibiотикорезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa*.

**Матеріали та методи дослідження**

Проведене вивчення ефективності комбінацій зазначених антибіотиків по відношенню до збудників гнійно-септичних захворювань – дев'яти клінічних полірезистентних штамів синьогнійної палички, виділених у хірургічних стаціонарах м. Харкова в 2008-2010 рр., та чотирьох штамів полірезистентних штамів синьогнійної палички, отриманих з музею мікроорганізмів ДУ “ІМІ НАМН”, які були типовими за своїми видовими якостями та відрізнялись

високою поліантibiотикорезистентністю. Для відбору таких штамів визначали їх МІК до протисиньогнійних препаратів - цефепіму, пиперацилін-тазобактаму, ципрофлоксацину, тіенаму, гентаміцину. Штами, які були резистентними до трьох та більше з зазначених препаратів, вважали полірезистентними. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями [11]. Встановлення рівня антибіотикорезистентності використаних в досліді штамів *P.aeruginosa* здійснювали методом «серійних розведень» та диско-дифузійним методом [12, 13]. При встановленні чутливості мікроорганізмів до фосфоміцину з метою приближення умов дослідження *in vitro* до умов *in vivo*, до розчину антибіотика додавали глюкозо-6-фосфат у рівній пропорції, оскільки фосфоміцин конкурує з глюкозо-6-фосфатом в системі його транспортування [14].

Дослідження ефективності комбінацій антибіотиків проводилося шляхом визначення мінімальних інгібуючих концентрацій рутинним методом в пробірках за методом «шахової дошки» [15]. Це найбільш придатний метод дослідження дії антимікробних комбінацій в досліді, оскільки він найбільш зручний у виконанні, в ньому використовуються прості математичні розрахунки. Для оцінки результатів використовували фракційний індекс інгібіції - Fix (the fraction inhibitory index).

$$Fix = FicA + FicB,$$

де Fic - фракційна інгібуюча концентрація.

$$FicA = Mic A \text{ в комбінації} / Mic A$$

Взаємодія антибіотиків оцінювалась наступним чином:

- при  $Fix \leq 0,5$  - синергізм;
- при  $Fix > 0,5$  і  $\leq 1,0$  - сумація;
- при  $Fix$  від 1 до 2 – індиферентність
- при  $Fix \geq 4,0$  - антагонізм.

Результати досліджень були піддані статистичній обробці з використанням методів параметричної статистики з розрахунком середньої арифметичної та стандартної похибки. Оцінка різниці показників проводилась за допомогою довірчого коефіцієнту. Результати вважали вірогідними, якщо

рівень значущості був 95 % ( $P \leq 0,05$ ), що прийнято при оцінці результатів біологічних досліджень.

### Результати досліджень

Результати проведених експериментальних досліджень комбінації цефепіму та фосфоміцину щодо полірезистентних штамів синьогнійної палички, наведені у таблиці 1, свідчать про значне зниження МІК цефепіму в комбінації щодо десяти з тринадцяти штамів. МІК фосфоміцину суттєво знижувалась по відношенню до дев'яти штамів. Середнє значення МІК фосфоміцину щодо

досліджених штамів *P.aeruginosa* в комбінації зменшилось у 2,6 разів, у порівнянні з його окремим використанням, а середнє значення МІК цефепіму зменшувалось у 4,9 разів. При розрахунку довірчого коефіцієнту рівень значущості показника середнього значення МІК був меншим за 95 % ( $P > 0,05$ ). У той же час, при розрахунку показника FІХ виявилось, що синергічний ефект дії дослідженої комбінації антибіотиків ( $FІХ \leq 0,5$ ) спостерігався щодо 69,2 % випробуваних штамів *P.aeruginosa*. В експериментах на трьох штаммах зафіксовано ефект сумачі протимікробної

Таблиця 1 - Ефективність протимікробної дії комбінації фосфоміцину та цефепіму щодо досліджуваних штамів *P.aeruginosa*

Штами <i>P.aeruginosa</i>	МІК цефепіму, мкг/мл		МІК фосфоміцину, мкг/мл		FІХ дослідженої комбінації антибіотиків
	окремо	в комбінації	окремо	в комбінації	
<i>P.aeruginosa</i> № 418	8,0	2,0	256	64	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 419	32,0	8,0	512	128	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 425	16,0	4,0	512	256	0,75
<i>P.aeruginosa</i> № 435	64,0	8,0	128	32	0,375
<i>P.aeruginosa</i> № 437	32,0	4,0	512	128	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 448	64,0	8,0	512	128	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 457	16,0	8,0	512	512	1,5
<i>P.aeruginosa</i> № 480	32,0	16,0	512	256	1,0
<i>P.aeruginosa</i> № 492	64,0	8,0	256	64	0,375
<i>P.aeruginosa</i> № 10726	4,0	1,0	512	128	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 10727	16,0	4,0	256	64	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 10728	16,0	4,0	128	64	0,75
<i>P.aeruginosa</i> № 10729	32,0	8,0	512	128	0,5
M	30,46	6,23	393,85	150,15	
±m	6,14	1,46	46,40	37,22	

Таблиця 2 . Ефективність протимікробної дії комбінації фосфоміцину та тіснату щодо досліджуваних штамів *P.aeruginosa*

Штами <i>P.aeruginosa</i>	МІК тіснату, мкг/мл		МІК фосфоміцину, мкг/мл		FІХ дослідженої комбінації антибіотиків
	окремо	в комбінації	окремо	в комбінації	
<i>P.aeruginosa</i> № 418	4,0	1,0	256,0	64,0	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 419	2,0	2,0	512,0	256,0	1,5

<i>P.aeruginosa</i> № 425	16,0	8,0	512,0	256,0	1,0
<i>P.aeruginosa</i> № 435	32,0	8,0	128,0	64,0	0,75
<i>P.aeruginosa</i> № 437	4,0	2,0	512,0	256,0	1,0
<i>P.aeruginosa</i> № 448	16,0	4,0	512,0	128,0	0,5
<i>P.aeruginosa</i> № 457	4,0	2,0	512,0	128,0	0,75
<i>P.aeruginosa</i> № 480	2,0	2,0	512,0	256,0	1,5
<i>P.aeruginosa</i> № 492	1,0	1,0	256,0	128,0	1,5
<i>P.aeruginosa</i> № 10726	0,5	0,5	512,0	512,0	2,0
<i>P.aeruginosa</i> № 10727	1,0	1,0	256,0	128,0	1,5
<i>P.aeruginosa</i> № 10728	0,5	0,5	128,0	64,0	1,5
<i>P.aeruginosa</i> № 10729	0,25	0,25	512,0	512,0	2,0
M	6,46	2,48	393,85	211,69	
+m	2,70	0,76	46,40	44,23	

дії антибіотиків зазначеної комбінації (  $FIX > 0,5, \leq 1,0$  ), на одному штамі – індиферентний ефект (  $FIX > 1,0$  ).

При комбінуванні фосфоміцину з тіенамом суттєве (більше, ніж у 2 рази) зменшення МІК зазначених антибіотиків спостерігалось лише щодо 2-х випробуваних культур синьогнійної палички. Середні значення МІК тіенаму при окремому використанні склали  $6,46 \pm 2,70$  мкг/мл, а в комбінації -  $2,48 \pm 0,76$  мкг/мл, фосфоміцину -  $393,85 \pm 46,40$  мкг/мл та  $211,69 \pm 44,23$  мкг/мл, відповідно.

Розрахунок показника  $FIX$  показав, що сумісне застосування фосфоміцину з тіенамом створювало переважно індиферентний ефект відносно досліджуваних штамів синьогнійної палички.

Статистична обробка отриманих результатів дослідження показала (рис.), що відносна кількість поліантибіотикорезистентних штамів *P.aeruginosa*, на яких зафіксована синергійна дія комбінації фосфоміцину з цефепімом (  $69,23 \pm 13,32\%$  ), вірогідно перевищувала (  $P < 0,05$  ) зазначений показник, отриманий при тестуванні комбінації фосфоміцину з тіенамом (  $15,38 \pm 10,42\%$  ). Також статистично достовірна різниця зберігалась при порівнянні частоти індиферентної дії зазначених комбінацій антибіотиків.

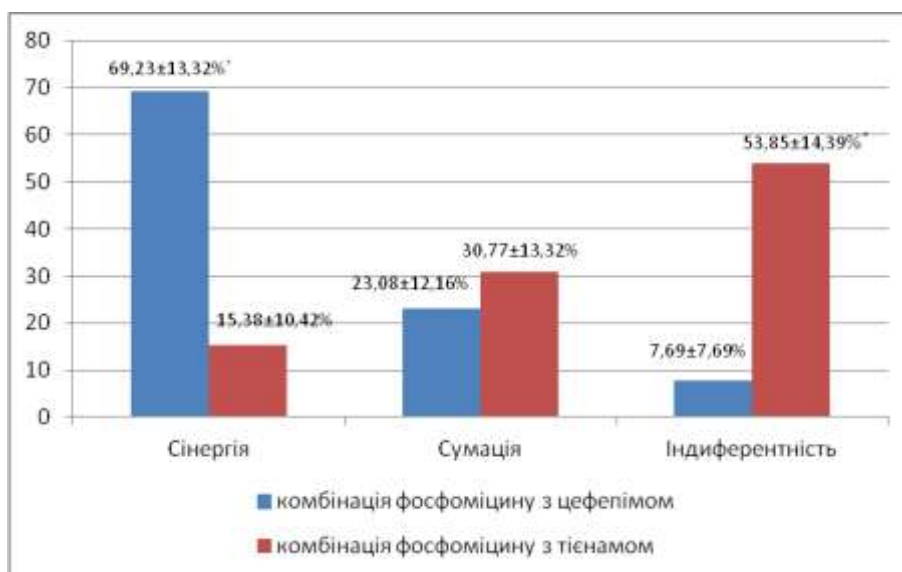


Рис. Порівняльна характеристика ефективності протимікробної дії комбінації фосфоміцину з цефепімом та фосфоміцину з тіенамом щодо досліджуваних штамів *P. aeruginosa*

Аналіз наукових публікацій за темою проведених нами досліджень підтверджує значну поширеність в різних країнах світу повідомлень стосовно вивчення ефективності комбінування фосфоміцину з іншими антибіотиками.

Багато дослідників розглядають фосфоміцин як потенційний синергійний компонент в комбінації з іншими препаратами у зв'язку з унікальністю його хімічної структури та досить малою молекулярною масою, яка дозволяє швидко накопичуватись у тканинах організму, а також - через відсутність перехресної резистентності з антибіотиками інших груп та відносно повільний розвиток резистентності серед збудників.

За повідомленням Okazaki зі співавторами [16] комбінації фосфоміцину з амікацином, цефтазидимом, цефепімом та ципрофлоксацином створюють синергійний ефект по відношенню до полірезистентних штамів синьогнійної палички та ентеробактерій на більше, ніж 60 відсотках досліджених штамів.

У той же час група вчених під керівництвом Yamada S. та Нуо Y. [17] встановила синергійний ефект від комбінування фосфоміцину з ципрофлоксацином лише по відношенню до 27 % випробуваних в експериментах штамів *P. aeruginosa*.

В дослідженнях, проведених в Бразилії [18], у 2012-2013 роках на імipенемрезистентних та імipенемчутливих штамів синьогнійної палички, комбінації фосфоміцину з цефепімом, пиперациллин-тазобактамом, цефтазидимом створювали більш значний синергійний вплив на збудників (до 57 % чутливих штамів), ніж при комбінаціях з іншими загальноновизнаними протисиньогнійними антибіотиками ципрофлоксацином та імipенемом.

Вивчення протимікробних ефектів комбінування фосфоміцину з антибіотиками інших груп щодо клінічних цефтазидим-резистентних штамів *P. aeruginosa* методом «шахової дошки», проведене Pruekprasert P. зі співавторами [19] показало, що комбінація фосфоміцин - гентаміцин створювала синергійну дію щодо 4 % штамів, фосфоміцин-цефтазидим – 11 % штамів, імipенем – фосфоміцин – 38 % досліджених штамів.

Розбіжність даних про результати досліджень синергійного потенціалу фосфоміцину обумовлена, на наш погляд, використанням різними науковцями різних методів оцінки взаємодії антибіотиків в комбінаціях, а також відсутністю чітких критеріїв щодо відбору використаних в експериментах штамів мікроорганізмів. Але, узагальнюючи отримані нами результати досліджень, можна вважати, що вони корелюють за основними показниками з літературними даними.

## Висновок

Дослідження ефективності дії комбінації антибіотиків фосфоміцину з цефепімом та фосфоміцину з тіенамом на поліантибіотикорезистентні штами *P. aeruginosa* показало високу ступінь синергії комбінації

фосфоміцину з цефепімом. При комбінуванні фосфоміцину з тіенамом кількість поліантибіотикорезистентних штамів *P. aeruginosa*, на яких зафіксована синергійна дія, була незначною.

## References

- Gorbunov, V A. Multi-center study of nosocomial antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the Republic of Belarus [Text] / V. A. Gor-bunov, L. P. Titov, T. S. Ermakova // Health Care . - 2007 . - № 1. - P. 28-31 .
- International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module// J. Infect Control . – 2014. – Vol.42. – P. 942–956.
- Khachatryan, NN. Modern fluoroquinolones in the treatment of diffuse peritonitis[Text]/N.Hachatryan, N.K.Vabishevich, B.G.Muslimov, A.A.Vays-berg, A.A.Mihaylin, T.A.Fesenko // Consilium Medicum . – 2012. - Vol.14 . - №4 . – P. 14–20.
- Mostovoy, YM. Pharmaco-epidemiological analysis of the use of antibiotics for the treatment of community-acquired pneumonia [Text] / YM Mostovoy, AV Demchuk // Ukrainian pulmonological Journal .- 2008. – № 3. – P. 63–66.
- Gerich, ID. Problems treatment intra-abdominal infections, carbapenems place in their resolution [Text] / ID Gerich, VV Vashchuk // Rational antibiotic therapy.– 2012. -№3(9). – P. 5-7.
- AI-Hasan, M.N. Betalactam and fluoroquinolone combination antibiotic therapy for bacteremia caused by gram-negative bacilli [Text] / M. N. AI-Hasan, J. W. Wilson, B. D. Lahr, et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – Vol. 53, (4). - P. 1386–1394.
- Mishalov, VG. Location and effectiveness of cefoperazone and sulbactam combination th in abdominal surgery [Text] / VG Mishalov, A. Burka, LY Markulan, SM Goyda, VA Zosima, JO Wisniewski // Surgery.- 2012. - №1(41). – P. 46-51.
- Kastoris, Antonia & Petros. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-Positive and Gram-negative bacteria [Text] / Antonia C. Kastoris & Petros, I. Rafailidis & Evridiki K., Vouloumanou & Ioannis D. Gkegkes. // Eur. J. Clin. Pharmacol. - 2010. – Vol. 66. – P.359–368.
- Argyris S., Michalopoulos. The revival of fosfomycin [Text] /Argyris S. Michalopoulos, Ioannis G. Livaditis, Vassilios Gougoutas. //International Journalof Infectious Diseases. –2011. - Vol. 15, №11, P. 732–739.
- Cai ,Y. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infecti-ons in a rat model. [Text] /Cai Y, Fan Y,Wang R,An MM, Liang BB.//J.Antimicrob Chemother.-2009.- Vol. 64 (3).- P.421-423
- Hult, D. Identification bakteriy Burgi [Text] / A. Hult, N.Krieg, P. Sneath [translation. from English. GA Zavarzin]. -Academic Press, 2001. – 800 p.
- The study of the specific activity of the antimicrobial drug [Text]: guidelines // Gromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Disease of the National

Academy of Medical Sciences of Ukraine. - Delhi , 2004 . - P. 32.

13. Antibiotogram : disk diffusion method. Interpretation of the results [Text ] / edited by Sidorenko S.V., Kolupava V.E. - M: [ BV ] - 1999 . - P. 34 .

14. Fosfomycin. Spectrum of activity, pharmacological properties and clinical experience with parenteral forms a unique antibiotic (based on foreign clinical and experimental studies) [Text]: Information Kit for physicians. / Scientific Information Center LLC "ABOLmed", 2005 – 52 c.

15. Eliopoulos G. M., Moellering R. C. Antimicrobial combinations. In Antibiotics in Laboratory Medicine, 1996, 4th edn (Lorian, V., Ed.),. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. P. 365–412.

16. Okazaki , M. Effectiveness of fosfomycin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using the efficacy time index assay. [Text] /Okazaki M, Suzuki K, Asano N, Araki K. J Infect Chemother.- 2002.- Mar;8(1).- P. 37-42.

17. Yamada, S. Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomycin on drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. [Text] /Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, Ohuchi M.// Chemotherapy. – 2007. - Vol. 53(3).- P. 202-9.

18. Santos, DA. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. [Text] /Santos DA., Nascimento MM, Vitali LH, Martinez R.// Rev Soc Bras Med Trop. – 2013. - Vol. 46(3) - P. 299-303.

19. Pruekprasert, P. In vitro activity of fosfomycin-gentamicin, fosfomycin-ceftazidime, fosfomycin-imipenem and ceftazidime-gentamicin combinations against ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. [Text] / Pruekprasert P, Tunyapanit W.// J Trop Med Public Health. – 2005. - Vol. 36(5) - P. 1239-42.

the experiments performed by *P.aeruginosa* strains of "serial dilutions" and the disco-diffusion method. The efficacy of combinations of antibiotics was carried out by determining the minimum inhibitory concentrations routine method in vitro method "checkerboard". The results of experimental studies the combination of cefepime on multiresistant strains Fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* show a significant decrease in the MIC of cefepime in combination on ten of the thirteen strains. MIC Fosfomycin significantly decreased relative to the nine strains. In calculating the index FIX appears that a synergistic effect of the combination of antibiotics studied ( $FIX \leq 0,5$ ) was observed on 69.2% of the subjects strains of *P.aeruginosa*. In experiments on three strains observed effect summation antimicrobial antibiotics specified combinations ( $FIX > 0,5, \leq 1,0$ ), one strain - indifferent effect ( $FIX > 1.0$ ). You can also combined fosfomycin with tiename significant (greater than 2-fold) reduction in MIC these antibiotics was observed only for 2 subjects cultures *P. aeruginosa*. Calculation of the FIX showed that combined use of fosfomycin with tiename created largely indifferent effect refers to the strains of *P. aeruginosa*. Thus, studies have shown a high degree of synergy combination of fosfomycin with cefepime on polyantibiotic-resistant strains strains of *P. aeruginosa*.

**Keywords:** combinations of the antibiotics, polyantibiotic-resistant strains, checkerboard method.

### UDC 579:845:616-002.3

#### THE STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMBINATIONS OF FOSFOMYCIN WITH CEFEPIME AND FOSFOMYCIN WITH TIENAME IN RESPECT POLYANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Dyachenko V.F. , Yagniuk Yu.A., Mariushchenko A.M., Kutsay N.M.

The rapid decrease in sensitivity of pathogens septic infections to antimicrobial agents has led to significant difficulties in the fight against antibiotic-resistant infections even in developed countries. One solution to this problem is a method of combining antimicrobial different pharmacological groups. The most promising for combination drugs are derivatives of phosphonic acids, which are able to deeply penetrate biological film and microbial cells and enhance the antibacterial action of other antibiotics. A study of the effectiveness of combination antibiotic fosfomycin with cefepime and fosfomycin with tiename on polyantibiotic-resistant strains *Pseudomonas aeruginosa*. Set the antibiotic used in