

В. А. Горбунов

Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и эффекты комбинаций антибиотиков *in vitro*

Белорусский государственный медицинский университет

Исследована резистентность 150 клинических штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам и их комбинациям *in vitro*. Штаммы *P. aeruginosa* характеризуются высокой частотой резистентности к антисинегнойным антибиотикам: к цефтазидиму-17,3%, к амикацину и карбенициллину-51,3%, к ципрофлоксацину-78,7%. Антисинегнойные антибиотики в порядке убывания активности: цефтазидим > меропенем > карбенициллин > цефепим > амикацин > ципрофлоксацин > цефотаксим > имипенем > доксициклин > хлорамфеникол. Более активные комбинации антибиотиков в отношении *P. aeruginosa*: цефтазидим+амикацин и цефотаксим+амикацин. Ключевые слова: антибиотикорезистентность, эффекты комбинаций антибиотиков.

Pseudomonas aeruginosa обладает природной чувствительностью к β -лактамным антибиотикам (цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему), аминогликозидам и фторхинолонам, которые обычно являются эффективными при терапии синегнойной инфекции. Кроме того, еще более эффективны для этих целей комбинации β -лактамных антибиотиков и аминогликозидов [4, 5].

Однако в последние десятилетия в связи с широким применением антимикробных препаратов штаммы бактерий обладают приобретенной резистентностью ко многим антибиотикам. Клинические штаммы бактерий, характеризующиеся полирезистентностью к антибиотикам, являются основными возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ). Синегнойная палочка (*P. aeruginosa*)-один из основных возбудителей ВБИ в хирургических стационарах, отделениях интенсивной терапии, является этиологическим фактором инфекций ран, мочевыделительной и респираторной систем, сепсиса, особенно у иммунокомпромитированных пациентов. Возбудителями этих инфекций нередко являются полирезистентные к антибиотикам штаммы, устойчивые не только к отдельным препаратам, но и к широко применяемым их комбинациям. Выбор антибиотиков для терапии синегнойной инфекции ограничен небольшим кругом доступных и эффективных препаратов [1, 2].

Развитие множественной лекарственной устойчивости клинических штаммов *P. aeruginosa* связано с продукцией β -лактамаз, гиперпродукцией цефалоспоринызы AmpC или неферментных механизмов устойчивости, таких как активное выведение антибиотика (эффлюкс), опосредованное такими системами эффлюкса как MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN и MexXY-OprM, которые обуславливают приобретенную резистентность как

последствие гиперэкспрессии генов эффлюкса, вызванной мутационными процессами [4].

Результаты многолетнего микробиологического мониторинга антибиотикорезистентности *P. aeruginosa* свидетельствуют о росте частоты и расширении спектра устойчивости, что вероятно будет происходить и в будущем [1]. Очевидно, что с ростом резистентности бактерий к антибиотикам будет снижаться эффективность стандартных режимов их дозирования. Это стимулирует разработку новых схем терапии и новых антимикробных препаратов.

Цель настоящего исследования состояла в оценке эффекта действия ряда антибиотиков и их комбинаций в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* *in vitro*.

Материал и методы

Исследовано 150 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из клинического материала (образцы отделяемого ран, мокроты, мочи, крови и др.), взятого у больных, находившихся на стационарном лечении, с клинически и лабораторно подтвержденной синегнойной инфекцией, развившейся в разных стационарах Республики Беларусь.

Идентификацию бактерий проводили с помощью морфологического, культурального и биохимического (API 20NE, bioMerieux, Франция) методов. Определение чувствительности *P. aeruginosa* осуществляли методом двукратных серийных разведений субстанций антибиотиков или препаратов с известной активностью в агаре Мюллера-Хинтон. Определяли значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) карбенициллина (КАР), цефотаксима (ЦТМ), цефтазидима (ЦЗМ), цефепима (ЦПМ), имипенема (ИМП), меропенема (МЕР), амикацина (АКЦ), доксициклина (ДОК), хлорамфеникола (ХЛФ), цiproфлоксацина (ЦИП), а также комбинаций из двух препаратов: карбенициллин/амикацин, карбенициллин/ciproфлоксацин, цефотаксим/амикацин, цефотаксим/ciproфлоксацин, цефтазидим/амикацин, цефтазидим/ciproфлоксацин, ciproфлоксацин/амикацин, ciproфлоксацин/доксициклин и хлорамфеникол/доксициклин в соотношении 1:1. Выбор комбинаций осуществляли в соответствии с правилами рациональной комбинированной антимикробной химиотерапии [2]. Оптимальными сочетаниями антибиотиков являются препараты с разными механизмами, но со сходным типом действия (бактерицидный или бактериостатический).

Определение чувствительности и интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями CLSI, США. Для тестирования использовали бактериальную суспензию, соответствовавшую стандарту мутности 0,5 McFarland. Инкубацию проводили при 35°C в течение 16-20 ч. Внутренний контроль качества проводили параллельным тестированием контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

При исследовании антимикробного действия комбинаций антибиотиков определяли значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК)

активно действующих веществ отдельных препаратов и их смеси 1:1. При сочетанном (комбинированном) применении антибиотиков выделяют несколько типов действия: синергидный, когда действие комбинации превышает эффекты простой суммы эффектов отдельных препаратов, аддитивный (сложение эффектов), индифферентный (нейтральный) и антагонистический, когда эффект комбинации ниже эффектов отдельных препаратов. Тип комбинированного действия двух антибиотиков (при соотношении 1:1, мкг) считали:

синергидным, если: $МИК_k < \min МИК_m$;

аддитивным, если: $МИК_k = \min МИК_m$;

индифферентным, если: $МИК_k = 2 \min МИК_m$;

антагонистическим, если: $МИК_k > 2 \min МИК_m$;

где: $МИК_k$ – МИК комбинации антибиотиков; $\min МИК_m$ – минимальное значение МИК монопрепарата из комбинации.

При характеристике чувствительности к антибиотикам микроорганизмов использовали общепринятые показатели – «чувствительные-S», «умеренно резистентные-I» и «резистентные-R». При характеристике чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков использовали критерии препарата из комбинации с более низкими значениями пограничных концентраций.

Для интегральной характеристики лекарственной устойчивости использовали термин «нечувствительные» штаммы, объединяющий умеренно резистентные и резистентные микроорганизмы [3].

Статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel (7.0 для Windows XP) и Statistica 5.5.

Результаты и обсуждение

Результаты определения чувствительности к антибиотикам исследованных штаммов *P. aeruginosa* обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Активность антибиотиков и их комбинаций в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* (n=150), выделенных в стационарах Республики Беларусь

Антибиотики и их комбинации (1:1)	МИК _{min} , мг/л	МИК _{max} , мг/л	МИК ₅₀ , мг/л	МИК ₉₀ , мг/л	Нечувствительные штаммы, %
Карбенициллин	1.0	512	256	512	60.0
Цефотаксим	0.25	128	64	128	91.4
Цефтазидим	1	128	4	64	28.0
Цефепим	2.0	128	16	64	62.0
Имипенем	1.0	128	16	32	94.0
Меропенем	0.5	32	8	16	57.3
Амикацин	1.0	128	64	128	70.0
Доксициклин	0.125	128	32	128	98.7
Хлорамфеникол	0.5	128	128	128	98.7
Ципрофлоксацин	0.063	128	32	128	78.7
Карбенициллин/Амикацин	0.5	128	64	128	62.0
Карбенициллин/Ципрофлоксацин	0.063	128	32	128	80.7
Цефотаксим/Амикацин	1.0	128	32	128	49.4
Цефотаксим/Ципрофлоксацин	0.125	128	64	128	80.7
Цефтазидим/Амикацин	0.5	128	8	64	22.0
Цефтазидим/Ципрофлоксацин	0.25	128	8	128	53.4
Ципрофлоксацин/Амикацин	0.125	128	32	128	79.3
Ципрофлоксацин/Доксициклин	0.25	128	32	64	70.0
Хлорамфеникол/Доксициклин	0.5	128	128	128	94.7

Наибольшей активностью в отношении исследованных штаммов *P. aeruginosa* обладали β -лактамы препараты: цефтазидим, меропенем, карбенициллин, цефепим. Наиболее активными комбинациями антибиотиков явились цефтазидим/амикацин, цефотаксим/амикацин, цефтазидим/ципрофлоксацин и карбенициллин/амикацин.

Из семейства пенициллинов антисинегной активностью обладают карбоксипенициллины (карбенициллин, тикарциллин) и уреидопенициллин (азлоцилин, мезлоциллин, пиперациллин). Большинство этих препаратов являются высокоактивными против *P. aeruginosa*, но редко используются в Республике Беларусь. Карбенициллин проявил умеренную активность в отношении синегнойной палочки (60% нечувствительных штаммов). Необходимо отметить, что для лечения синегнойной инфекции этот препарат следует использовать в дозах до 40 г/сут [2].

Наименьшая частота резистентности выявлена к цефтазидиму: нечувствительными были 42 штамма (28,0 %) *P. aeruginosa*, в том числе 16 (10,7 %) с промежуточным уровнем устойчивости. Вторым по активности цефалоспорином явился цефепим (IV поколение). Нечувствительными к нему были 96 (62,0 %) штаммов, из которых резистентными являлись 44 (29,3 %), умеренно резистентными-52 (34,7 %). Цефотаксим оказался наименее активным в отношении возбудителя синегнойной палочки, которая, по мнению ряда авторов [3], обладает к этому антибиотику природной устойчивостью. Вместе с тем, имеются исследования *in vitro* и клинические наблюдения эффективного его применения в отношении псевдомонад.

Из группы карбапенемов максимальную активность продемонстрировал меропенем, устойчивыми к которому были 63 штамма (42,0 %), умеренно-устойчивыми – 23 (15,3 %). К имипенему нечувствительными оказались 94 % исследованных штаммов синегнойной палочки, в том числе 22,7% штаммов с промежуточной чувствительностью. Этот антибиотик не должен являться препаратом выбора для эмпирической терапии синегнойной инфекции.

Наиболее активным и широко применяемым при синегнойной инфекции аминогликозидом считается амикацин. Нечувствительными к нему были 105 (70,0 %) штаммов *P. aeruginosa*. Из них 28 (18,7%) обладали промежуточным уровнем резистентности, а 77 (51,3%) были резистентными. Базовый фторхинолон с антисинегнойной активностью – цiproфлоксацин проявил умеренную активность в отношении исследованных штаммов. Резистентными к нему были 118 (78,7%) штаммов *P. aeruginosa*. Хлорамфеникол (левомицетин) и доксициклин не имеют практического значения для терапии синегнойной инфекции. Нечувствительными к этим антибиотикам были 98,7% исследованных штаммов.

Используя комбинированную антибиотикотерапию (сочетания антибиотиков), преследуют либо усиление антимикробного эффекта, либо возможность снижения доз антибиотиков. Из исследованных сочетаний антибиотиков высокую антимикробную активность проявили цефтазидим/амикацин, цефотаксим/амикацин, цефтазидим/ципрофлоксацин и карбенициллин/амикацин, удельный вес нечувствительных штаммов к которым составил 22,0; 49,4; 53,4 и 62,0% соответственно.

Данные об ассоциированной резистентности штаммов *P. aeruginosa* представлены в таблице 2.

Таблица 2

Перекрестная резистентность клинических штаммов *P. aeruginosa*

Антибиотики	Число резистентных штаммов	Удельный вес резистентных штаммов, %								
		Цефтазидим	Цефепим	Карбенициллин	Меропенем	Амикацин	Имипенем	Цiproфлоксацин	Доксициклин	Хлорамфеникол
Цефтазидим	26		69,2	57,7	50,0	53,9	69,2	73,1	80,8	84,6
Цефепим	44	40,9		50,0	43,2	61,4	70,5	79,6	84,1	97,7
Карбенициллин	61	26,2	36,1		65,6	68,9	86,9	93,4	96,7	95,1
Меропенем	63	22,2	30,2	63,5		54,0	100,0	88,9	92,1	100,0
Амикацин	77	18,2	35,1	54,6	44,2		74,1	94,8	93,5	97,4
Имипенем	107	17,8	29,0	49,5	58,9	53,3		85,1	90,7	98,1
Цiproфлоксацин	118	17,0	29,7	48,3	47,5	61,9	77,1		94,1	97,5
Доксициклин	133	16,5	27,8	44,4	43,6	54,1	72,9	83,5		98,5
Хлорамфеникол	144	16,0	29,9	40,3	43,8	52,1	72,9	79,9	91,0	

Большинство или все меропенеморезистентные штаммы *P. aeruginosa* были резистентны к имипенему, цiproфлоксацину, доксициклину, хлорамфениколу и карбенициллину. Вместе с тем, только около 44% амикацино-, доксициклино-и хлорамфениколоустойчивых, 47,5% цiproфлоксацино-и 58,9% имипенемостойчивых штаммов были резистентны к меропенему. Резистентные к цефтазидиму *P. aeruginosa* были наиболее чувствительны к меропенему (50 %) и амикацину (53,9%). В отношении цiproфлоксацинорезистентных штаммов наибольшей активностью обладали цефтазидим, к которому были устойчивыми 17,0% изолятов и цефепим (29,7%). Большинство штаммов устойчивых к карбенициллину были чувствительны к цефалоспорином, но резистентны к антибиотикам других групп.

Данные о наиболее частых фенотипах множественной устойчивости нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* представлены в таблице 3.

Таблица 3

Наиболее частые фенотипы множественной устойчивости штаммов *P. aeruginosa* (n=150)

Антибиотики	Абс. число штаммов, (%)
ХФЛ	143 (95,3)
ХФЛ, ДОК	130 (86,7)
ХФЛ, ДОК, ЦИП	108 (72,0)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП	83 (55,3)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП, АКЦ	48 (32,0)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП, АКЦ, МЕР	30 (20,0)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП, АКЦ, МЕР, КАР	24 (16,0)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП, АКЦ, МЕР, КАР, ЦЛМ	5 (3,3)
ХФЛ, ДОК, ЦИП, ИМП, АКЦ, МЕР, КАР, ЦЛМ, ЦЗМ	1 (0,7)

Наиболее частыми фенотипами устойчивости были: хлорамфеникол, доксициклин (86,7%), хлорамфеникол, доксициклин, цiproфлоксацин (72,0%), хлорамфеникол, доксициклин, цiproфлоксацин, имипенем (55,3 %). Реже *P. aeruginosa* была одновременно устойчива к хлорамфениколу, доксициклину, цiproфлоксацину, имипенему и амикацину (32,0%). Ассоциированная резистентность к 6 антибиотикам-хлорамфениколу, доксициклину, цiproфлоксацину, имипенему, амикацину и меропенему – была выявлена у 20 % изолятов. Резистентным ко всем исследованным антибиотикам оказался 1 штамм (0,7%), чувствительных ко всем антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* не было обнаружено.

Типы действия разных комбинаций антибиотиков в отношении разных штаммов *P. aeruginosa* оказались неодинаковыми (рис.1).

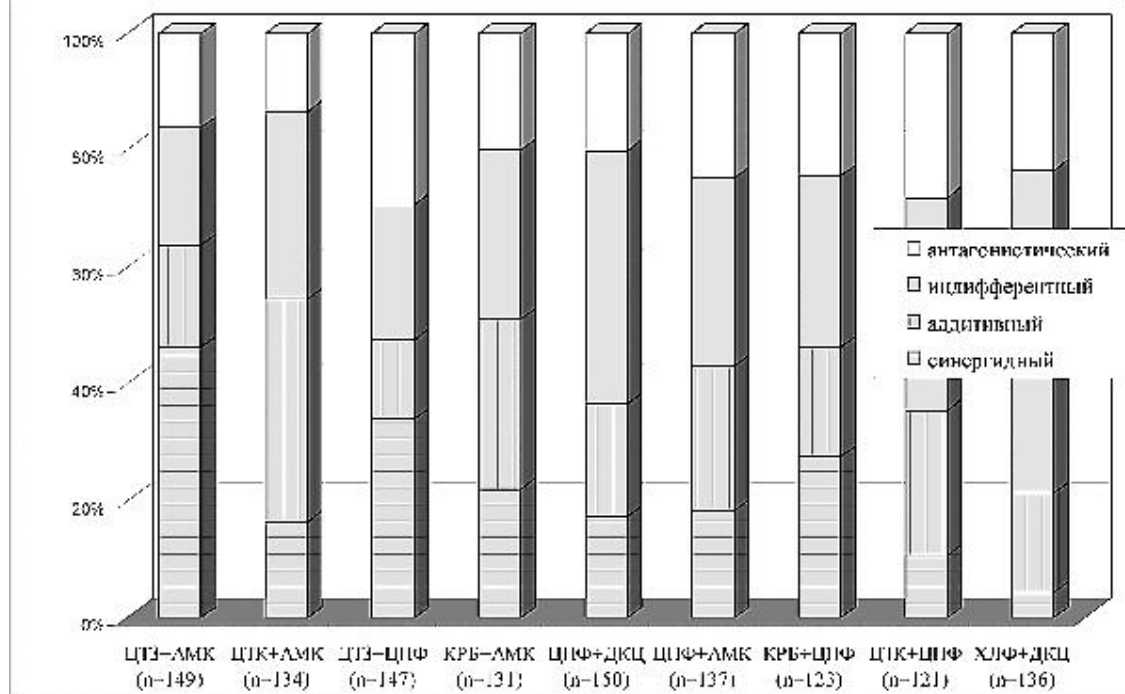


Рис. 1. Тип действия комбинаций антибиотиков на штаммы *P. aeruginosa*.

Максимальный удельный вес штаммов с синергидным действием на них комбинации антибиотиков выявлен при сочетании цефтазидима/амикацина, несколько меньший при сочетании цефтазидима/ципрофлоксацина и карбенициллина/ципрофлоксацина. Если синергидный и аддитивный типы взаимодействия антибиотиков в комбинации назвать «положительным эффектом», то он в большей степени характерен для цефтазидима/амикацина, цефотаксима/амикацина, карбенициллина/амикацина, цефтазидима/ципрофлоксацина и карбенициллина/ципрофлоксацина. Незначительным положительным эффектом характеризовались комбинации хлорамфеникол/доксциклин и цiproфлоксацин/доксциклин.

При комбинировании антибиотиков *in vitro* (табл.4) достоверно увеличился удельный вес чувствительных штаммов к цефтазидиму/амикацину и цефотаксиму/амикацину по сравнению с отдельными препаратами, входящими в эти комбинации. При других сочетаниях антибиотиков удельный вес чувствительных к комбинации штаммов, как правило, ниже соответствующего показателя одного (более активного) и выше второго препарата из комбинации. Вместе с тем, следует отметить, что в комбинациях антибиотики находились в соотношении 1:1, т.е. в ряде случаев возможно увеличение дозы хотя бы одного из членов комбинации в пределах допустимой токсичности.

Таблица 4

Удельный вес штаммов *P. aeruginosa* чувствительных и резистентных к антибиотикам и их комбинациям. Удельный вес штаммов с разным типом действия на них комбинаций антибиотиков

Антибиотики	Отдельные антибиотики		Комбинация из 2 антибиотиков (1:1)			
	S, %	R, %	S, %	R, %	Синергидный + аддитивный, %	Антагонистический, %
Цефтазидим	72,0	17,3	88,0*	10,7	63,8	16,1
Амикацин	30,0	51,3				
Цефотаксим	8,6	80,7	50,6*	16,7*	54,5	13,4
Амикацин	30,0	51,3				
Цефтазидим	72,0	17,3	46,6	52,7	47,6	29,3
Цiproфлоксацин	21,3	78,7				
Карбенициллин	40,0	40,7	38,0	24,7	51,1	19,9
Амикацин	30,0	51,3				
Цiproфлоксацин	21,3	78,7	30,0	68,7	36,6	20,0
Доксциклин	1,3	88,7				
Цiproфлоксацин	21,3	78,7	20,7	79,3	43,1	24,8
Амикацин	30,0	51,3				
Карбенициллин	40,0	40,7	19,3	80,7	46,3	24,4
Цiproфлоксацин	21,3	78,7				
Цефотаксим	8,6	80,7	19,3	80,7	35,5	28,1
Цiproфлоксацин	21,3	78,7				
Хлорамфеникол	1,3	96,0	5,3	90,0	21,3	23,5
Доксциклин	1,3	88,7				

Примечание. *-различия соответствующих показателей отдельных АБП и их комбинаций достоверны ($p < 0,01$).

Для практического использования полученные результаты сочетанного действия антибиотиков представлены в табл. 5.

Таблица 5

Рациональные сочетания антибиотиков (1:1) in vitro против *P. aeruginosa* (% чувствительных/ умеренно устойчивых штаммов)

Антибиотик	Пенициллины (Карбенициллин)	Цефалоспорины (Цефотаксим)	Цефалоспорины (Цефтазидим)	Тетрациклины (Доксициклин)	Хлорамфеникол	Аминогликозиды (Амикацин)	Фторхинолоны (Ципрофлоксацин)
Пенициллины (Карбенициллин)		*	*	**	**	38,0/ 37,3	19,3/ 0
Цефалоспорины (Цефотаксим)	+		*	**	**	50,7/ 32,7	19,3/ 0
Цефалоспорины (Цефтазидим)	+	*		**	**	88,0/ 1,3	46,7/ 0,7
Тетрациклины (Доксициклин)	**	**	**		5,3/ 4,7	**	30,0/ 1,3
Хлорамфеникол	**	**	**	5,3/ 4,7		**	**
Аминогликозиды (Амикацин)	38,0/ 37,3	50,7/ 32,7	88,0/ 1,3	**	**		20,7/ 0
Фторхинолоны (Ципрофлоксацин)	19,3/ 0	19,3/ 0	46,7/ 0,7	30,0/ 1,3	**	20,7/ 0	

Примечания. *-антибиотики с одинаковым механизмом действия комбинировать нецелесообразно; **-комбинирование антибиотиков с бактерицидным и бактериостатическим действием нерационально;- достоверное ($p < 0,01$). увеличение чувствительности штаммов при сочетании антибиотиков (с синергидным и аддитивным взаимодействием) по сравнению с отдельными препаратами;-умеренное (недостоверное) увеличение чувствительности штаммов при сочетании антибиотиков по сравнению с отдельными препаратами;-отсутствие преимуществ сочетания перед отдельными антибиотиками.

Т.о. существующая в настоящее время высокая частота и уровни резистентности к антибиотикам клинических штаммов *P. aeruginosa* в Беларуси является серьезной эпидемиологической и терапевтической проблемой, которая требует разработки новых схем терапии и новых антимикробных препаратов.

Для выбора эффективных схем комбинированной антибиотикотерапии инфекций, вызванных множественно-устойчивыми штаммами бактерий целесообразно определение чувствительности, как к отдельным препаратам, так и к их комбинациям.

Выводы

1. Клинические штаммы *P. aeruginosa* характеризуются значительной частотой резистентности к антисинегнойным антибиотикам: к цефтазидиму – 17,3%, к амикацину и карбенициллину-51,3%, к ципрофлоксацину – 78,7%.

2. Наиболее частыми фенотипами множественной устойчивости *P. aeruginosa* являются: хлорамфеникол, доксициклин (86,7%), хлорамфеникол,

доксциклин, ципрофлоксацин (72,0%), хлорамфеникол, доксициклин, ципрофлоксацин, имипенем (55,3 %).

3. Активные в отношении синегнойной палочки препараты в порядке убывания активности распределяются следующим образом: цефтазидим > меропенем > карбенициллин > цефепим > амикацин > ципрофлоксацин > цефотаксим > имипенем > доксициклин > хлорамфеникол.

4. Комбинациями антибиотиков, в которых чаще проявляются синергидный и аддитивный эффекты в отношении *P. aeruginosa*, явились цефтазидим+амикацин и цефотаксим+амикацин.

Литература

1. Горбунов, В.А. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в Республике Беларусь / В.А. Горбунов, Л.П. Титов, Т.С. Ермакова // Здоровоохранение. – 2007. – №1. – С. 28-31.

2. Ребенок, Ж.А. Рациональная антибиотикотерапия: Инструкция по применению / Ж.А. Ребенок; М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. университет 24.03.2003 г. Рег. № 79 – 0602. – Минск, 2003. – 24 с.

3. Страчунский, Л.С. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии России / Л.С. Страчунский [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2003. – Т.5, № 1. – С. 35-46.

4. Шагинян, И. А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – Т.7, № 3. – С. 271 – 285.

5. Oie, S. In vitro effects of combinations of antipseudomonal agents against seven strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / S. Oie [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 52, № 6. – P. 911-914.