

IN VITRO АКТИВНОСТ НА АНТИБИОТИЧНИ КОМБИНАЦИИ СРЕЩУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

М. Божкова¹, Т. Стоева¹, Р. Марковска², К. Божкова¹ и И. Митов²

¹Катедра по микробиология, Медицински университет – Варна

²Катедра по медицинска микробиология, Медицински университет – София

IN VITRO ACTIVITIES OF ANTIMICROBIAL COMBINATIONS AGAINST CLINICAL ISOLATES OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

M. Bojkova¹, T. Stoeva¹, R. Markovska², K. Bojkova¹ and I. Mitov²

¹Department of Microbiology, Medical University – Varna

²Department of Medical Microbiology, Medical University – Sofia

Резюме:

Цел: Да се проучи чувствителността на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* към антибактериални препарати и да се определи ефектът от комбинираното им прилагане. **Материал и методи:** Проучени са 27 недублиращи се клинични изолати *S. maltophilia*, изолирани в периода 2007-2014 г. от пациенти на МБАЛ „Света Марина“ – Варна. Минималната потискаща концентрация на десет антимикробни лекарствени средства беше определена чрез Е-тест. Ефектът от 5 различни антибиотични комбинации (levofloxacin + ceftazidime, ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin + tigecycline, doxycycline + colistin и chloramphenicol + polymyxin B) бе изпитан чрез Е-тест-базиран метод. **Резултати:** Най-активният препарат беше tigecycline (96.3% чувствителност), следван от polymyxin B, doxycycline и trimethoprim/sulfamethoxazole (85.1%). В групата на β-лактамните антибиотици ограничена *in vitro* активност бе установена за ticarcillin/clavulanic acid (25.9%) и ceftazidime (37%). При две от антибиотичните комбинации (levofloxacin + ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole) бе доказан ефект на синергизъм в над 50% (55.6-66.7%). Комбинирането на полимиксиновите антибиотици с дохусуцине и chloramphenicol, както и комбинацията tigecycline + ciprofloxacin се асоциираха предимно с индиферентен ефект (74.1-88.9%). **Изводи:** Настоящото проучване демонстрира добрата активност на trimethoprim/sulfamethoxazole и levofloxacin и установява *in vitro* синергичен ефект при комбинирането им с β-лактамните препарати ticarcillin/clavulanic acid и ceftazidime.

Ключови думи:

Stenotrophomonas maltophilia, антибиотични комбинации, синергизъм, Е-тест

Адрес за кореспонденция:

Д-р Милена Божкова, Катедра „Микробиология и вирусология“, Медицински университет, ул. „Марин Дринов“ № 55, 9001 Варна, тел. 052 978538, e-mail: drbojkovam@abv.com

Summary:

Aim: To study the susceptibility of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* to antimicrobial agents and to determine the *in vitro* activities of antibiotic combinations against these isolates. **Material and methods:** A total of 27 clinical isolates of *S. maltophilia*, isolated during the period 2007-2014 from patients hospitalized in University Hospital “Saint Marina” – Varna, were studied. The minimal inhibitory concentration of ten antimicrobial agents was determined by E-test. The effect of five different combinations (levofloxacin + ceftazidime, ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin + tigecycline, doxycycline + colistin, chloramphenicol + polymyxin B) was studied by E-test based method. **Results:** The most active antimicrobial agents were tigecycline (96.3% susceptibility), followed by polymyxin B, doxycycline and trimethoprim/sulfamethoxazole (85.1%). In the group of β-lactam antibiotics, limited *in vitro* activity of ticarcillin/clavulanic acid (25.9%) and ceftazidime (37%) was detected. The combinations levofloxacin + ceftazidime and ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole were associated with synergistic ef-

<p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>fect against the clinical isolates in more than 50% (55.6 – 66.7%). The combinations of polymyxin antimicrobial agent (colistin / polymyxin B) with doxycycline and chloramphenicol respectively as well as the combination tygecycline + ciprofloxacin exhibited predominantly indifferent effect (74.1-88.9%). Conclusions: This study demonstrated the good activity of trimethoprim/sulfamethoxazole and levofloxacin and their in vitro synergistic effect when combined with the β-lactam antimicrobial agents ticarcillin/clavulanic acid and ceftazidime.</p> <p><i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, antibiotic combinations, synergy, E-test</p> <p>Milena Bojkova, M.D., Department of Microbiology, Medical Universit, 55, Marin Drinov St., Bg – 9001 Varna, tel. +359 52 978538, e-mail: drbojkovam@abv.com</p>
--	--

УВОД

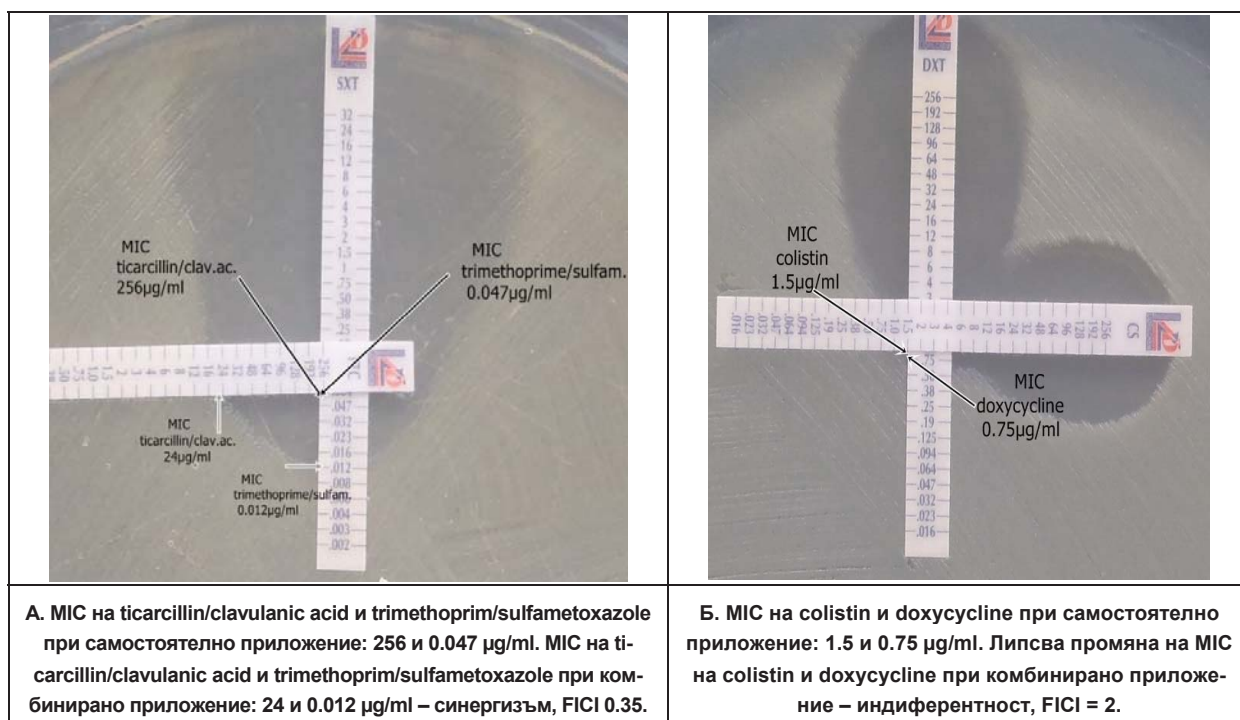
Stenotrophomonas maltophilia е Грам-отрицателен опортюнистичен патоген. Причинява разнообразни в клиничната си изява инфекции, основно сред имунокомпрометирани пациенти и такива с тежки хронични заболявания. Една от характерните особености на този бактериален вид е вродената му устойчивост към по-голяма част от употребяваните в клиничната практика антибактериални средства – почти всички β -лактамни съединения (включително карбапенемите), аминогликозиди, trimethoprim, fosfomycin и по-старите хинолонови препарати като nalidix acid. Като средство на първи избор за лечение на свързаните със *S. maltophilia* инфекции сега се препоръчва препаратът trimethoprim/sulfamethoxazole. Алтернатива на тази терапия са ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin. Придобита устойчивост в различна степен е отбелязана към всички тези препарати, което често налага комбинирано антибиотично лечение. Допълнителен фактор за предпочитане на комбинираната антибиотична терапия пред монотерапията е и фактът, че в случая със *S. maltophilia*, trimethoprim/sulfamethoxazole (а вероятно и ticarcillin/clavulanic acid) имат бактериостатична активност [15]. Прилагането на антибиотични комбинации е честа практика в лечението на предизвиканите от този бактериален вид инфекции с цел по-добро клинично повлияване и избягване на развитието на резистентност. В същото време стандартното определяне на антибиотичната чувствителност не позволява обективно да се определи взаимодействието на антимикробните препарати при съвместното им прилагане. Класическите методи за детекция на синергизъм като „time-kill” и „checkerboard” не се прилагат рутинно, тъй като са бавни и трудни за изпълнение и получените резултати са несъпоставими. Двата класически метода се различават принципно по това, че докато „time-kill” установява бактерицидният ефект на тестваната антибиотичната комбинация, „checkerboard” представя данни само за инхибиращата активност.

Напоследък са разработени методики, базирани на епсилонметричния метод (Е-тест), които дават възможност лесно и бързо да бъде установен потенциалният синергичен ефект от комбинираната антибиотична терапия. В практиката са навлезли няколко различни техники на изпълнение на тези тестове. Независимо от факта, че получените резултати по различните методики са трудно съпоставими – от една страна, помежду си, а от друга – с класическите тестове, определянето на синергизъм чрез Е-тест навлиза в рутинната практика поради простотата на изпълнение и достъпността си.

Цел на настоящото проучване е да се изпита чувствителността на клинични изолати *S. maltophilia* към антибактериални лекарствени средства и да се определи ефектът от комбинираното им приложение чрез Е-тест-базиран метод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучени са 27 недублиращи се клинични изолати *S. maltophilia*, изолирани в периода 2007-2014 г. от пациенти на МБАЛ „Света Марина” – Варна. Минималната потискаща концентрация (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) на десет антибактериални препарата (trimethoprim/sulfamethoxazole, ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin, doxycycline, tigecycline, chloramphenicol, polymyxin B, colistin) беше определена чрез епсилонметричния тест (Е-тест) в съответствие с инструкциите на производителя (Liofilchem s.r.l.). Ефектът от 5 антибиотични комбинации бе определен чрез Е-тест-базиран метод [14]. Накратко, след предварително инокулиране на изпитвания изолат върху Мюлер-Хинтон агар според изискванията за определяне на MIC, Е-тест стриповете се поставят кръстосано под ъгъл 90° върху агара, като пресичането е мястото на предварително определената MIC. След инкубация за 18-24 часа на 35° С се определя получената „нова” MIC чрез визуално отчитане на стойността в точката на пресичане на зоната на инхибиране на бактериалния растеж и Е-тест стрипа за всеки от препаратите в комбинацията (фиг. 1).



Фиг. 1. In vitro определяне на взаимодействието на антибактериалните препарати чрез Е-тест

За определяне на ефекта от комбинацията първоначално се изчислява частичната инхибираща концентрация (fractional inhibitory concentration, FIC) за всеки от препаратите в съответната антибиотична комбинация. Използвани бяха следните формули:

FIC A (препарат **A**) = MIC (препарат **A** в комбинация) / MIC (препарат **A** при самостоятелно приложение);

FIC B (препарат **B**) = MIC (препарат **B** в комбинация) / MIC (препарат **B** при самостоятелно приложение).

Сборът от двете стойности определи индекса на частичната инхибираща концентрация, FICI:

$$FICI = FIC A + FIC B$$

Стойностите на FICI бяха интерпретирани, както следва: FICI ≤ 0.5 – синергизъм, FICI > 0.5 до ≤ 1 – адитивен ефект, FICI > 1 до ≤ 4 – индиферентност (липса на взаимодействие) и FICI > 4 – антагонизъм [7].

РЕЗУЛТАТИ

На табл. 1 са представени резултатите от определянето на чувствителността към всеки един от антибактериалните препарати чрез Е-тест.

На табл. 2 са представени резултатите от изпитването на взаимодействието при комбинирана антибиотична употреба на всички 27 изолата.

Таблица 1. Резултати от изпитване на чувствителността на изолати *S. maltophilia* чрез Е-тест към набор от антимикробни лекарствени средства

Антибиотик	MIC диапазон (µg/ml)	S		I		R	
		брой	%	брой	%	брой	%
trimethoprim/sulfamethoxazole	0.016-32	23	85.1%	0	0%	4	14.9%
ticarcillin/clavulanic acid	6-256	7	25.9%	8	29.7%	12	44.4%
ceftazidime	1-256	10	37.0%	1	3.7%	16	59.3%
ciprofloxacin	0.75-32	10	37.0%	6	22.2%	11	40.8%
levofloxacin	0.125-32	22	81.5%	2	7.4%	3	11.1%
doxycycline	0.5-256	23	85.1%	2	7.4%	2	7.4%
tigecycline	0.09-3	26	96.3%	1	3.7%	0	0%
chloramphenicol	4-64	9	33.3%	9	33.3%	9	33.3%
polymyxin B	0.064-6	23	85.1%	0	0%	4	14.9%
colistin	0.016-24	17	63.0%	1	3.7%	9	33.3%

S, чувствителност; I, интермедиерна чувствителност; R, резистентност

Таблица 2. Ефект (синергизъм, антагонизъм, адитивност, индиферентност) на антибиотичните комбинации върху 27 клинични изолата *S. maltophilia* в процент и брой (n)

Антибиотична комбинация	Syn %, (n)	Ad %, (n)	Ind %, (n)	Ant % (n)
trimethoprim/sulfamethoxazole + ticarcillin/clav. acid	55.6% (15)	14.8% (4)	25.9% (7)	3.7% (1)
ciprofloxacin + tigecycline	7.4% (2)	3.7% (1)	88.9% (24)	– (0)
levofloxacin + ceftazidime	66.7% (18)	14.8% (4)	14.8% (4)	3.7% (1)
doxycycline + colistin	7.4% (2)	3.7% (1)	81.5% (22)	7.4% (2)
chloramphenicol + polymyxin B	3.7% (1)	18.5% (5)	74.1 (20)	3.7 (1)

Syn, синергизъм; Ad, адитивност; Ind, индиферентност; Ant, антагонизъм

ОБСЪЖДАНЕ

Комбинираната употреба на антимикробни лекарствени средства е честа практика, особено в терапията на тежки инфекции, причинени от полирезистентни бактерии. В същото време определянето на комбинирания антибиотичен ефект *in vitro* остава предизвикателство за микробиологичната диагностика. На този етап няма валидиран референтен метод, който да позволи въвеждане на подобни тестове в рутинната лабораторна практика. През последните години е натрупан сравнително богат опит с прилагането на Е-тест-базираните методи. В сравнение с класическите методи като „time kill” и “checkerboard”, те са значително по-лесно изпълними и пригодени за употреба в ежедневната лабораторна дейност. Макар някои автори да съобщават за липса на съпоставимост при сравнение на резултатите по различните методи [11, 12], други проучвания отбелязват добра корелация между тях, особено при *S. maltophilia* [5, 7, 14]. Все още обаче липсват достатъчно клинични данни, документиращи реалния синергичен потенциал на антибиотичните комбинации.

Нашите резултати сочат, че две от общо петте изпитани антибиотични комбинации (levofloxacin + ceftazidime и ticarcillin/clavulanic acid + trimethoprim/sulfamethoxazole) демонстрират в над 50% ефект на синергизъм (фиг. 1А). При останалите три антибиотични комбинации (ciprofloxacin + tigecycline, doxycycline + colistin и chloramphenicol + polymyxin B) доминираше ефектът на индиферентност (74.1-88.9%) (фиг. 1Б). Само при единични изолати *S. maltophilia* бе отчетен антагонистичен ефект.

С най-висок относителен дял на синергизъм (66.7%) *in vitro* бе комбинацията между levofloxacin и ceftazidime. И двата препарата са утвърдени в лечебната практика и са чест избор при лечение на асоциираните със *S. maltophilia* заболявания. Препаратът levofloxacin е с подобри фармакокинетични свойства в сравнение с по-старите препарати като ciprofloxacin и според някои проучвания е с най-висока активност спрямо този бактериален вид при самостоятелно приложение [3]. Резултатите от изпитването на чувствителността към levofloxacin потвърждават

дават високата активност на този антибиотик, като 81.5% от изолатите демонстрираха чувствителност. За разлика от levofloxacin, спрямо ceftazidime се установяват високи нива на резистентност при самостоятелното му изпитване (63%). Независимо от този факт обаче, предвид високия относителен дял на изолатите, при които тази комбинация има синергичен ефект, прилагането на ceftazidime в комбинация с levofloxacin е оправдано от клинична гледна точка. Проучването на Vissali и колеktiv върху 20 клинични изолата *S. maltophilia*, също доказва синергизъм на комбинацията levofloxacin и ceftazidime при над 50% от тестваните изолати чрез методите “checkerboard” и “time kill” [13].

Макар и в по-малка степен, превес на синергичен антибиотичен ефект (55.6%) бе отчетен и по отношение на комбинацията trimethoprim/sulfamethoxazole и ticarcillin/clavulanic acid. Самостоятелното изпитване на активността на trimethoprim/sulfamethoxazole показва високата му активност с относителен дял на чувствителните изолати 85.1% с много ниски MIC в границите 0.016-0.5 µg/ml. Ticarcillin/clavulanic acid е сред малкото β-лактамни препарати с добра активност спрямо *S. maltophilia*, но нашите данни сочат, че активността му е ниска при самостоятелно приложение – 25.9% чувствителност. В комбинация с trimethoprim/sulfamethoxazole обаче установяваме синергичен ефект, като общият дял на изолатите, демонстрирали синергизъм и адитивност, надхвърля 70%. Това дава основание комбинацията от двата препарата да бъде препоръчана при лечението на свързаните със *S. maltophilia* заболявания [8, 10].

Единствените четири изолата, определени като резистентни към trimethoprim/sulfamethoxazole (MIC ≥ 32 µg/ml), бяха устойчиви и към ticarcillin/clavulanic acid (MIC = 64-256 µg/ml). Комбинираното приложение на trimethoprim/sulfamethoxazole и ticarcillin/clavulanic acid при тези 4 изолата се демонстрира с индиферентност. Това налага извода, че при високо ниво на устойчивост и към двата препарата не следва да се очаква синергизъм и респективно терапевтичен ефект, а да се търсят други алтернативни схеми за лечение. За разлика от нас при използването

на "time kill" и "checkerboard"-методите други автори установяват синергизъм при тази комбинация в случаи с trimethoprim/sulfamethoxazole-резистентни щамове *S. maltophilia* [8].

От данните за антибиотичната чувствителност на изолатите установихме, че най-активният препарат е tigecycline (табл. 1), като само при един от изолатите *S. maltophilia* бе отчетена интермедиерна чувствителност (MIC 4 µg/ml), а във всички останали случаи – напълно съхранена активност на препарата (MIC 0.09 – 2 µg/ml). При комбинирано тестване на tigecycline с ciprofloxacin само при два изолата се доказва *in vitro* синергизъм, а при един – адитивност. Във всички останали случаи при взаимодействието на препаратите се демонстрира индиферентност. Предимно индиферентен ефект при комбинирането на tigecycline и levofloxacin е документиран и в проучването на Church и кол. върху инвазивни изолати *S. maltophilia*, базирано на използваната от нас E-тест методика [1]. Този резултат не дава основание комбинирането на tigecycline с хинолонови препарати да бъде препоръчано за употреба в клиничната практика при лечение на инфекции, причинени от *S. maltophilia*.

В последните години употребата на полимиксини (polymyxin B и colistin) нараства все повече, като основна причина е увеличаването на относителния дял на инфекциите, причинени от полирезистентни грам-отрицателни бактерии, като *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и др. Активността на препаратите от тази група спрямо *S. maltophilia* е вариабилна, като процентът на чувствителните изолати варира в границите между 67.6% и 83% [2, 9]. Синергичен *in vitro* ефект е документиран при комбинираното им приложение с различни антибактериални препарати като rifampin, ceftazidime, meropenem и trimethoprim/sulfamethoxazole [5]. Нашите данни показват, че комбинирането на полимиксиновите антибиотици с tigecycline и chloramphenicol се асоциира предимно с индиферентен ефект (74.1-81.5%), което прави тези комбинации неудачни за клинично приложение. Единични са изолатите *S. maltophilia*, демонстриращи ефект на синергизъм, както и такива, демонстриращи ефект на антагонизъм.

Изводи

Комбинирането на антибиотични препарати често се използва в лечението на инфекции, причинени от полирезистентни бактерии, какъвто е *S. maltophilia*. Настоящото проучване потвърждава добрата активност на утвърдени в клиничната практика препарати като trimethoprim/sulfamethoxazole и levofloxacin, а също така установява *in vitro* синергичен ефект при комбинирането им с β-лактамни препарати като

ticarcillin/clavulanic acid и ceftazidime съответно. Тези данни дават насока за адекватен избор на комбинирана антибиотична терапия при пациенти със *S. maltophilia* асоциирани инфекции.

Библиография

1. Church, D., T. Lloyd, G. Peirano et al. Antimicrobial susceptibility and combination testing of invasive *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Scand J Infect Dis*, **45**, 2013, № 4, 265-270.
2. Hogardt, M., S. Schmidt, M. Gotzfried et al. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*, **54**, 2004, № 6, 1057-1061.
3. Jones, R., H. Sader, M. Beach. Contemporary *in vitro* spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents*, **22**, 2003, № 6, 551-556.
4. Landman, D., C. Georgescu, D. Martin et al. Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Reviews*, **21**, 2008, № 3, 449-465.
5. Manno, G., E. Ugolotti, M. L. Belli et al. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* from patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **22**, 2003, № 1, 28-34.
6. Moody, G. Synergism Testing: Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods – In *Clinical microbiology procedures handbook- 3rd edition* Garcia L. S (Ed.). ASM press Washington, DC, 2010, 5.12.1
7. Orhan, G., A. Bayram, Y. Zer et al. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*, **43**, 2005, № 1, 140-143.
8. Poulos, C. D., S. Matsumura, B. Willey et al. *In vitro* activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1995, № 10, 2220-2223.
9. Sader, H. S., R. Jones. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*, **25**, 2005, № 2, 95-109.
10. San Gabriel, P., J. Zhou, S. Tabibi et al. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob agents chemother*, **48**, 2004, № 1, 168-171.
11. Tan, T. Y., L. Ng, E. Tan et al. *In vitro* effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, **60**, 2007, № 2, 421-423.
12. Tan, T. Y., T. Lim, W. Lee et al. *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and E test methods. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 2011, № 1, 436-438.
13. Visalli, M. A., M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum. Activities of three quinolones, alone and in combination with extended-spectrum cephalosporins or gentamicin against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 1998, № 8, 2002-2005.
14. White, R. L., D. Burgess, M. Manduru et al. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1996, № 8, 1914-8.
15. Zelenitsky, S. A., H. Iacovides, R. Ariano et al. Antibiotic combinations significantly more active than monotherapy in an *in vitro* infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **51**, 2005, № 1, 39-43.