

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHỐI HỢP KHÁNG SINH IN VITRO TRÊN CÁC CHỦNG *ACINETOBACTER BAUMANNII* VÀ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* KHÁNG CARBAPENEM

Đặng Thị Việt Hương^{1*}
Vũ Thị Thương¹, Lê Thị Lan Anh¹
Lê Thị Thịnh², Nguyễn Thị Hoài Linh³
Phạm Thị Ánh Tuyết⁴, Phạm Việt Hùng¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát hiệu quả phối hợp kháng sinh meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin và colistin-ciprofloxacin in vitro trên các chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Đối tượng và phương pháp: Khảo sát phối hợp kháng sinh meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin và colistin-ciprofloxacin trên 17 chủng *A. baumannii* và 17 chủng *P. aeruginosa* bằng phương pháp bàn cờ. Đánh giá các mức độ tương tác của kháng sinh trong phối hợp dựa trên giá trị nồng độ ức chế phân đoạn (FIC).

Kết quả: Tác dụng hiệp đồng trên *A. baumannii* và *P. aeruginosa* lần lượt là 9/17 chủng và 9/17 chủng đối với meropenem-colistin; 6/17 chủng và 5/17 chủng đối với meropenem-ciprofloxacin; 4/17 chủng và 3/17 chủng đối với colistin-ciprofloxacin. Kết quả thu được với chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn nhỏ hơn hoặc bằng 0,5. Không xuất hiện tương tác đối kháng trên tất cả các chủng vi khuẩn đã thử nghiệm.

Kết luận: Phối hợp meropenem-colistin trên các chủng *A. baumannii* và *P. aeruginosa* cho hiệu quả hiệp đồng cao nhất, tiếp đến là phối hợp meropenem-ciprofloxacin và colistin-ciprofloxacin.

Từ khóa: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, phối hợp kháng sinh, nồng độ ức chế.

ABSTRACT

Objectives: To investigate the in vitro efficacy of the antibiotic combinations meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin, and colistin-ciprofloxacin on strains of *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Subjects and methods: The combinations of meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin, and colistin-ciprofloxacin were tested against 17 strains of *A. baumannii* and 17 strains of *P. aeruginosa* using the checkerboard method. Assessment of antibiotic interaction levels in combination based on the fractional inhibitory concentration index (FIC).

Results: The synergistic effects on *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were 9/17 strains and 9/17 strains for meropenem-colistin, 6/17 strains and 5/17 strains for meropenem-ciprofloxacin, 4/17 strains and 3/17 strains for colistin-ciprofloxacin, respectively. The results were obtained with a fractional inhibitory concentration index (FIC) of less than or equal to 0.5. Notably, no antagonistic interactions were observed in any of the tested strains.

Conclusions: The combination of meropenem-colistin showed the highest synergistic effect on the strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, followed by the combinations of meropenem-ciprofloxacin and colistin-ciprofloxacin.

Keywords: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, combination antibiotic therapy, inhibitory concentration.

Chịu trách nhiệm nội dung: Đặng Thị Việt Hương, Email: viethuongk61@gmail.com

Ngày nhận bài: 15/7/2024; mời phản biện khoa học: 07/2024; chấp nhận đăng: 18/7/2024.

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

²Bệnh viện Đa khoa Hà Đông.

³Bệnh viện Đa khoa Hà Giang.

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn bệnh viện gây nên bởi các vi khuẩn Gram âm đang là một thách thức lớn trong thực hành lâm sàng do nó làm gia tăng tình trạng kháng kháng

sinh [1]. Hai vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa* là các tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện chiếm tỉ lệ cao, đặc biệt tại

các đơn vị điều trị tích cực. Những năm qua, tỉ lệ phân lập *A. baumannii* và *P. aeruginosa* ngày càng tăng và tỉ lệ kháng carbapenem của chúng đang ở mức báo động [2]. Các kháng sinh còn có thể lựa chọn điều trị *A. baumannii* và *P. aeruginosa* kháng carbapenem hiện rất hạn chế. Chỉ có một số kháng sinh vẫn còn nhạy cảm (trong đó, colistin là kháng sinh được khuyến cáo lựa chọn hàng đầu), song tỉ lệ đề kháng với các kháng sinh này được báo cáo ngày càng tăng. Hạn chế trong các lựa chọn điều trị càng làm tăng thêm nhu cầu về kháng sinh mới. Tuy vậy, nghiên cứu kháng sinh mới mất nhiều thời gian, chi phí cao và cần thêm nhiều nghiên cứu để có thể áp dụng trên lâm sàng.

Giải pháp khả thi là tối ưu hóa sử dụng các kháng sinh sẵn có bằng cách phối hợp kháng sinh để hạn chế kháng thuốc. Trong đó, liệu pháp được khuyến cáo và nghiên cứu nhiều là phối hợp giữa meropenem và ciprofloxacin hoặc colistin hoặc amikacin. Điều này không chỉ làm tăng hiệu quả chống lại các *A. baumannii* và *P. aeruginosa* kháng carbapenem, hạn chế tình trạng xuất hiện các chủng kháng colistin mà còn có thể giảm liều colistin, giảm độc tính khi điều trị.

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu khảo sát hiệu quả phối hợp kháng sinh meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin và colistin-ciprofloxacin trong đối phó với các chủng *A. baumannii* và *P. aeruginosa*.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: 17 chủng *A. baumannii* và 17 chủng *P. aeruginosa* thu thập từ Bệnh viện Đa khoa Hà Đông và Bệnh viện Đa khoa Hà Giang, từ tháng 11/2022 đến tháng 02/2023. Các chủng vi khuẩn lựa chọn đã được xác định đề kháng carbapenem theo kết quả kháng sinh đồ thường quy tại bệnh viện.

+ Các chủng *A. baumannii* có MIC của meropenem từ 32-128 µg/ml, MIC của colistin từ 1-4 µg/ml, MIC của ciprofloxacin từ 16-256 µg/ml.

+ Các chủng *P. aeruginosa* có MIC của meropenem từ 32-256 µg/ml, MIC của colistin từ 0,25-4 µg/ml, MIC của ciprofloxacin từ 2-64 µg/ml.

- Vật liệu nghiên cứu: thử nghiệm sử dụng bột kháng sinh meropenem (Sigma, Đức), kháng sinh amikacin (Sigma, Đức), kháng sinh ciprofloxacin (Sigma, Đức), kháng sinh colistin (Sigma, Đức) và chất chỉ thị màu resazurin (Sigma, Đức). Kiểm soát chất lượng với chủng chuẩn *P. aeruginosa* (ATCC 27853) trong mỗi lần pha kháng sinh; mỗi thử nghiệm được thực hiện lặp 3 lần.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phối hợp kháng sinh meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin và colistin-ciprofloxacin được thực hiện bằng phương pháp bàn cờ.

+ Mỗi chủng được thử nghiệm phối hợp ở các nồng độ kháng sinh meropenem, ciprofloxacin và colistin trong dải nồng độ từ thấp nhất là 1/128 MIC tới nồng độ cao nhất là 4 MIC (tối đa 256 µg/ml). Mỗi giếng chứa 50 µl dung dịch của mỗi loại kháng sinh với nồng độ gấp đôi nồng độ mong muốn; thêm 10 µl huyền dịch có nồng độ vi khuẩn xấp xỉ 5×10^6 CFU/ml và 1 µl dung dịch chất chỉ thị màu resazurin. Thực hiện thử nghiệm phối hợp kháng sinh cùng với giếng chứng vi khuẩn, chứng canh thang, MIC đơn cho mỗi kháng sinh. Kết quả được đọc sau 18-24 giờ ủ ở 37°C.

+ Đánh giá các mức độ tương tác của kháng sinh trong phối hợp dựa trên giá trị nồng độ ức chế phân đoạn (FIC) [10]:

$$FIC = \frac{MIC(A \text{ khi có } B)}{MIC A} + \frac{MIC(B \text{ khi có } A)}{MIC B}$$

Với $FIC \leq 0,5$: hai kháng sinh có tác dụng hiệp đồng; với $0,5 < FIC < 2$: hai kháng sinh có tác dụng cộng hợp; với $FIC > 4$: hai kháng sinh có tác dụng đối kháng.

Các chủng có MIC lớn hơn giá trị tối đa trong dải nồng độ khảo sát ($> 256 \mu\text{g/ml}$), chúng tôi quy ước giá trị MIC = 512 µg/ml.

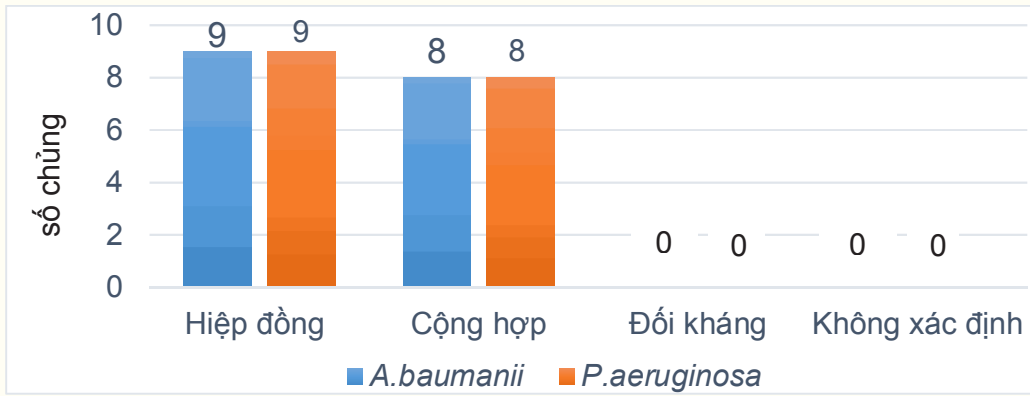
- Xử lí số liệu: số liệu được quản lí, lưu trữ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

- Đạo đức nghiên cứu: đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga thông qua với mã số 47/2022/VREC ngày 03/6/2022.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Hiệu quả phối hợp meropenem-colistin

Trên 17 chủng *A. baumannii* thử nghiệm, chúng tôi thấy 9 chủng (52,9%) có tác dụng hiệp đồng và 8 chủng (47,1%) có tác dụng cộng hợp. Tương tự, trên 17 chủng *P. aeruginosa* thử nghiệm, thấy 9 chủng (52,9%) có tác dụng hiệp đồng và 8 chủng (47,1%) có tác dụng cộng hợp. Không xuất hiện tương tác đối kháng trên tất cả các chủng thử nghiệm (hình 1).



Hình 1. Kết quả phối hợp meropenem-colistin.

Ngoài ra, ở 7/9 chủng *A. baumannii* và 5/9 chủng *P. aeruginosa* có tác dụng hiệp đồng, nồng độ meropenem giảm xuống dưới ngưỡng đề kháng theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (CLSI), năm 2024 [3] (bảng 1).

Bảng 1. MIC của meropenem (µg/ml) và colistin (µg/ml) trên 9 chủng *A. baumannii* và 9 chủng *P. aeruginosa* xuất hiện tương tác hiệp đồng

Chủng vi khuẩn	Meropenem		Colistin		FIC	
	Đơn	Ph/hợp	Đơn	Ph/hợp		
<i>A. baumannii</i>	A2	32	4	1	0,25	0,37
	A3	64	8	1	0,25	0,37
	A4	64	2	1	0,25	0,28
	A8	64	2	2	0,5	0,28
	A10	32	2	1	0,25	0,31
	A16	32	1	1	0,25	0,28
	A17	64	4	4	1	0,56
	A21	128	8	2	0,25	0,18
	A22	64	0,5	1	0,25	0,26
<i>P. aeruginosa</i>	P1	128	16	1	0,25	0,38
	P3	32	4	2	0,25	0,25
	P4	256	64	0,25	0,25	0,5
	P6	16	1	4	1	0,31
	P9	256	8	4	1	0,28
	P11	32	2	4	0,5	0,19
	P18	8	0,25	0,5	0,064	0,16
	P25	32	2	4	0,25	0,13
	P30	128	8	1	0,25	0,31

Kết quả tương tác hiệp đồng trên các chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Daoud và cộng sự năm 2013 (tác dụng hiệp đồng giữa meropenem và colistin quan sát thấy ở 6/11 chủng *A. baumannii*, chiếm 54,5% [4]). Tuy nhiên, một nghiên cứu gần đây của Kheshti và cộng sự năm 2019 cho kết

quả ngược lại với nghiên cứu của chúng tôi (chỉ có 10% tác dụng hiệp đồng khi kết hợp colistin và meropenem giữa các chủng *A. baumannii* [5]).

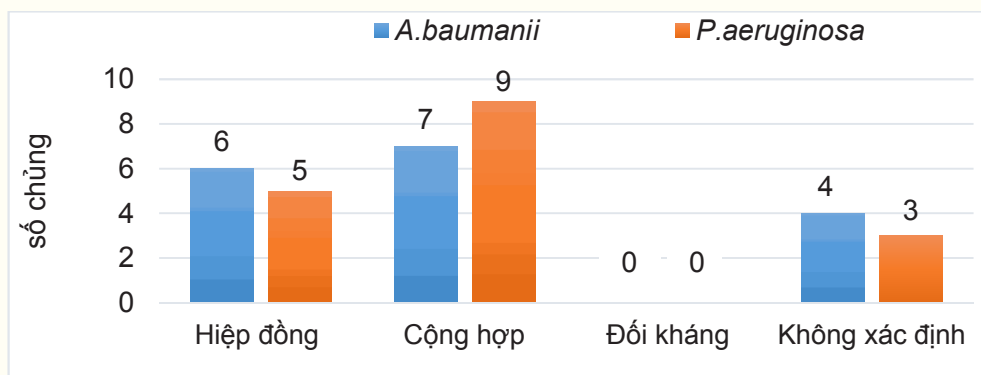
Thử nghiệm phối hợp meropenem-colistin trên các chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu này cũng cho kết quả tương đồng với nghiên cứu của Ramadan và cộng sự năm 2018 (trên 43 chủng *A. baumannii*, tác dụng hiệp đồng là 63,6% và tác dụng cộng hợp là 36,4% [6]). Tuy nhiên, nghiên cứu của Daoud và cộng sự năm 2013 cho thấy kết quả khi phối hợp meropenem và colistin là 27,2% hiệp đồng và 63,6% cộng hợp [4]. Chúng tôi không quan sát thấy tác dụng đối kháng trong nghiên cứu hiện tại cho cả *A. baumannii* và *P. aeruginosa*.

A. baumannii và *P. aeruginosa* là những tác nhân hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện, hiện đã kháng với các kháng sinh thông dụng như aminoglycoside, beta-lactam, beta-lactam kết hợp chất ức chế beta-lactamase và meropenem. Vì vậy, colistin được coi là lựa chọn điều trị cuối cùng. Tuy nhiên, nếu chỉ sử dụng colistin, có thể dẫn đến kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii* và *P. aeruginosa* [7]. Hơn nữa, việc phối hợp meropenem-colistin có thể giúp hạn chế tình trạng xuất hiện các chủng kháng colistin và giảm độc tính của colistin.

3.2. Hiệu quả phối hợp meropenem và ciprofloxacin

Phối hợp meropenem và ciprofloxacin trên 17 chủng *A. baumannii*, cho kết quả 6 chủng (35,3%) xuất hiện tác dụng hiệp đồng, 7 chủng (41,2%) cho tác dụng cộng hợp. Trên 17 chủng *P. aeruginosa*, thấy 5 chủng (29,4%) cho tác dụng hiệp đồng và 9 chủng (52,9%) cho tác dụng cộng hợp. Không xuất hiện tương tác đối kháng trên tất cả các chủng thử nghiệm (hình 2).

Chúng tôi cũng thấy rằng ở 6/6 chủng *A. baumannii* và 3/5 chủng *P. aeruginosa* có tác dụng hiệp đồng, MIC meropenem và ciprofloxacin đều giảm xuống dưới ngưỡng kháng theo hướng dẫn của CLSI [3] (bảng 2).



Hình 2. Kết quả phối hợp meropenem-ciprofloxacin.

Bảng 2. MIC của meropenem (µg/ml) và ciprofloxacin (µg/ml) trên 6 chủng *A. baumannii* và 5 chủng *P. aeruginosa* xuất hiện tương tác hiệp đồng

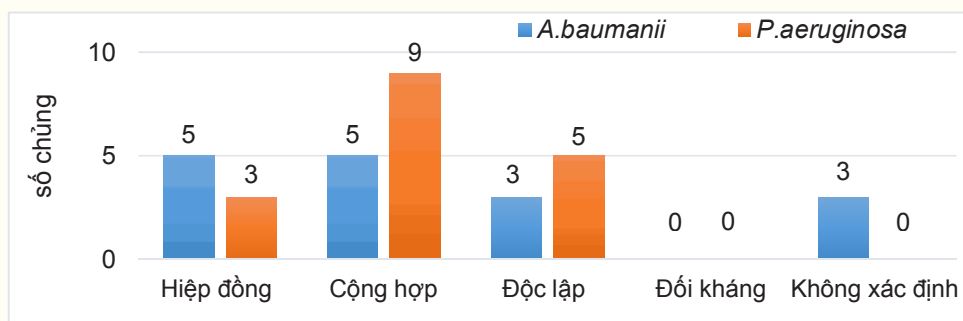
Chủng vi khuẩn		Meropenem		Ciprofloxacin		FIC
		Đơn	Ph/hợp	Đơn	Ph/hợp	
<i>A. baumannii</i>	A1	64	1	64	2	0,05
	A7	64	0,5	> 256	2	0,01
	A11	32	0,5	> 256	2	0,02
	A16	32	2	64	1	0,08
	A21	128	1	16	0,5	0,04
	A24	32	0,5	32	0,5	0,03
<i>P. aeruginosa</i>	P3	32	2	8	0,5	0,13
	P6	16	2	32	4	0,25
	P11	32	1	2	0,5	0,28
	P18	8	1	16	1	0,19
	P25	32	4	16	2	0,25

Với meropenem và ciprofloxacin trong nghiên cứu này, chúng tôi quy ước giá trị MIC = 512 µg/ml cho các chủng có MIC > 256 µg/ml. Điều này có thể dẫn tới đánh giá sai khả năng tương tác của một số chủng từ hiệp đồng trở thành cộng tác dụng hoặc không phân giải được kết quả.

Khi phối hợp meropenem và ciprofloxacin, tác dụng hiệp đồng chỉ xuất hiện ở 6 chủng (35,3%) *A. baumannii* và 5 chủng (29,4%) *P. aeruginosa*. Nghiên cứu của Erdem 1 năm 2002 thấy tác dụng hiệp đồng trên 2 chủng (6,2%) *P. aeruginosa*. Nghiên cứu của Ek-akaranawakul năm 2010 trên 20 chủng *P. aeruginosa* cũng chỉ ra không có sự thay đổi về giá trị MIC khi thử nghiệm đơn lẻ và khi phối hợp meropenem và ciprofloxacin.

3.3. Hiệu quả phối hợp colistin và ciprofloxacin

Thử nghiệm phối hợp colistin và ciprofloxacin trên 17 chủng *A. baumannii* và 17 chủng *P. aeruginosa*, chúng tôi thấy tác dụng hiệp đồng chỉ xuất hiện ở 4 chủng (23,5%) *A. baumannii* và 3 chủng (17,6%) *P. aeruginosa* (hình 3).



Hình 3. Kết quả phối hợp colistin-ciprofloxacin.

Ngoài ra, ở 3/4 chủng *A. baumannii* và 2/3 chủng *P. aeruginosa* có tác dụng hiệp đồng, MIC colistin và ciprofloxacin giảm xuống dưới ngưỡng kháng theo hướng dẫn của CLSI [3] (bảng 3).

Dữ liệu về thử nghiệm phối hợp colistin và ciprofloxacin đến nay còn ít được báo cáo. Hai nghiên cứu năm 1999 (của Rynn và cộng sự) và 1993 (của Richards và cộng sự) đã chỉ ra: phối hợp colistin với ciprofloxacin có xu hướng làm giảm sự phát triển của vi khuẩn *P. aeruginosa* đa kháng hơn so với đơn trị liệu [8], [9]. Nghiên cứu của Meliani và cộng sự năm 2020 trên 21 chủng *A. baumannii* và 39 chủng *P. aeruginosa* cũng chỉ quan sát thấy tác dụng hiệp đồng ở 3 chủng (14,29%) *A. baumannii* và 6 chủng (15,28%) *P. aeruginosa* [10].

Bảng 3. MIC của colistin (µg/ml) và ciprofloxacin (µg/ml) trên 4 chủng *A. baumannii* và 3 chủng *P. aeruginosa* xuất hiện tương tác hiệp đồng

Chủng	Colistin		Ciprofloxacin		FIC	
	Đơn	Ph/hợp	Đơn	Ph/hợp		
<i>A. baumannii</i>	A5	1	0,25	32	2	0,31
	A10	1	0,25	16	2	0,38
	A21	2	0,5	16	1	0,31
	A24	1	0,125	32	4	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	P9	4	1	32	2	0,31
	P19	2	0,25	32	0,5	0,27
	P28	4	0,25	8	0,25	0,09

Hiện nay, có nhiều phương pháp khác nhau để kiểm tra tác dụng hiệp đồng. Trong khi phương pháp E-test cố định nồng độ kháng sinh và phương pháp đánh giá khả năng diệt khuẩn theo thời gian khó thử nghiệm trên nhiều chủng do mất nhiều thời gian thì phương pháp bàn cờ có thể điều chỉnh nồng độ kháng sinh. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã cho thấy sự tương đồng từ 33-100% giữa phương pháp E-test và thử nghiệm khả năng diệt khuẩn và cả 2 phương pháp này đều cho tỉ lệ hiệp đồng thấp hơn so với phương pháp bàn cờ. Nghiên cứu của Ni và cộng sự cho thấy tỉ lệ hiệp đồng tăng lên với thử nghiệm khả năng diệt khuẩn khi so sánh với phương pháp bàn cờ và E-test. Do đó, cần chuẩn hóa các phương pháp hiện có để đánh giá tác dụng hiệp đồng của phối hợp kháng sinh giúp giải quyết những hạn chế này.

Những kết quả trên đây cũng cho thấy cần có những nghiên cứu đánh giá hiệu quả trên lâm sàng của việc phối hợp kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn *A. baumannii* và *P. aeruginosa*. Đồng thời, mở rộng nghiên cứu hiệu quả phối hợp meropenem và colistin, meropenem và ciprofloxacin, colistin và ciprofloxacin trên các loại vi khuẩn khác để có thể đưa ra lựa chọn kháng sinh tối ưu trong điều trị.

4. KẾT LUẬN

Khảo sát in vitro phối hợp meropenem-colistin, meropenem-ciprofloxacin, colistin-ciprofloxacin trên 17 chủng *A. baumannii* và 17 chủng *P. aeruginosa* bằng phương pháp bàn cờ, kết quả:

- Tác dụng hiệp đồng trên *A. baumannii* và *P. aeruginosa* lần lượt là 9/17 chủng và 9/17 chủng đối với meropenem-colistin, 6/17 chủng và 5/17 chủng đối với meropenem-ciprofloxacin, 4/17 chủng và 3/17 chủng đối với colistin-ciprofloxacin.

- Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn nhỏ hơn hoặc bằng 0,5. Không xuất hiện tương tác đối kháng trên tất cả các chủng đã thử nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peleg Y, Hooper C (2010), "Hospital-Acquired infections due to gram-negative bacteria", *The New England J. Med.*, 2010, 362(19): 1804-1813.
2. Magill S, Edwards J, Bamberg W, et al (2014), "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections", *The New England Journal Medicine*, 2014, 370(13): 1198-1208.
3. Ramadan A, Gebriel G, Kadry M, et al (2018), "Carbapenem-resistant acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: Characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations", *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11: 1261-9.
4. Daoud Z, Mansour N, Masri K (2013), "Synergistic combination of carbapenems and colistin against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*", *Journal of medical microbiology*, 2013, 12(1): 93.
5. Cetin S, Tekeli A, Ozseven G, Us E, Aridogan B (2013), "Determination of in vitro activities of polymyxin B and rifampin in combination with ampicillin/sulbactam or cefoperazone/sulbactam against multidrug resistant *A. baumannii* by the E test and checkerboard methods", *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2013, 66: 4638.
6. Erdem I, Kaynar-Tascioglu J, Kaya B, Goktas P (2002), "The comparison of in the vitro effect of imipenem or meropenem combined with ciprofloxacin or levofloxacin against multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2002, 20: 384-386.
7. Ek-akaranawakul K, Chanprapaph S, et al (2010), "In vitro antimicrobial activities of meropenem, ciprofloxacin, colistin alone and in combinations against meropenem-resistant *P. aeruginosa*", *Thai J. Pharmacol*, 2010, 32 (1): 62-64.
8. Rynn C, Wootton M, Bowker E, Alan H, Reeves S (1999), "In vitro assessment of colistin's antipseudomonal antimicrobial interactions with other antibiotics", *Clinical Microbiology and Infection*, 1999, 5: 32-36.
9. Richards M et al (1993), "Investigation of synergism between combinations of ciprofloxacin, polymyxin, sulphadiazine and paminobenzoic acid", *J. of Pharmacy and Pharmacology*, 1993, 45: 171-175.
10. Meliani S, et al. (2020), "Synergistic combination of colistin with imipenem, amikacine or ciprofloxacin against *A. baumannii* and *P. aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in Annaba hospital Algeria", *Biocell*, 2020, 44(2): 175-182. □