



Санджай Мохан Шривастава,
Сандип Саурабх, Дхармендра
Рай, Вівек Кумар Двіведі,
Ману Чаудхарі

Медичний науково-дослідний
центр компанії «Венус», Індія

© Колектив авторів

ОРИГІНАЛЬНА КОМБІНАЦІЯ ФІКСОВАНИХ ДОЗ ЦЕФТРИАКСОНУ ТА СУЛЬБАКТАМУ: ПОРІВНЯННЯ IN VITRO МІКРОБНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТУ СУЛЬБАКТОМАКС І ЦЕФТРИАКСОНУ

Резюме. Мікроорганізми, чутливі до бета-лактамних антибіотиків, швидко набувають стійкості через виробництво мікроорганізмами бета-лактамаз. Це дослідження спрямоване на оцінку антимікробної ефективності препарату Сульбактомакс, інноваційної комбінації фіксованих доз бета-лактамного антибіотику Цефтриаксону та інгібітору бета-лактамаз сульбактаму. Ефективність оцінювали на основі мінімальної подавляючої концентрації (МПК) та аналізу кривої залежності мікробного навантаження від часу для бактерій *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* та *Klebsiella pneumoniae*. МПК Сульбактомаксу для *E. coli* була 0,0625 мг/л, тоді як Цефтриаксон окремо показав значення МПК 0,25 мг/л. У випадку бактерій *S. aureus* та *P. aeruginosa* значення мінімальної подавляючої концентрації становило 1 мг/л для Сульбактомаксу та 2 мг/л для Цефтриаксону. Виявлено достовірне зниження значення МПК: від 32 мг/л Цефтриаксону до 8 мг/л Сульбактомаксу для бактерій *Bacillus subtilis*, та від 16 мг/л Цефтриаксону до 2 мг/л Сульбактомаксу для *Klebsiella pneumoniae*.

У всіх досліджуваних організмів, аналіз кривої залежності мікробного навантаження від часу продемонстрував загибель більшості бактерій на 6 годині. Сульбактомакс продемонстрував кращу бактерицидну активність, ніж окремо Цефтриаксон.

Також встановлено, що Сульбактомакс справляє більшу бактеріально-подавляючу активність у порівнянні з монотерапією Цефтриаксоном в дослідженні *in vitro*.

Ключові слова: Сульбактомакс, цефтриаксон, МПК, крива залежності мікробного навантаження від часу.

Вступ

Цефалоспорини третього покоління ввели в клінічну практику на початку 1980-х, і з того часу вони служили як ефективні і достатньо безпечні засоби для лікування багатьох серйозних інфекцій [8]. Нещодавно поява бета-лактамаз розширеного спектру (БЛРС), що відповідають за набуту стійкості деяких ентеробактерій, ставить під загрозу ефективність цефалоспоринів третього покоління в клінічній практиці [4, 18].

Багато мікроорганізмів, що спочатку були чутливими до бета-лактамного антибіотику цефтриаксону, стали стійкими внаслідок утворення бета-лактамаз [14]. Бета-лактамаза була вперше виявлена у кишкової палички *Escherichia coli* в 1940 році [20]. Цікаво знати, що коли вперше з'явилися напівсинтетичні пеніциліни виробництво бета-лактамази у деяких патогенів було вже досить поширене [16]. Минулі спроби протистояти стійкості до бета-лактамів були спрямовані на створення нових цефалоспоринів, більш стійких до ферментативного гідролізу. Відтак, досвід по-

казує, що згодом бактерії виробляють нову бета-лактамазу, яка руйнує і ці більш стабільні препарати. Більш сучасний і, можливо, більш фундаментальний підхід ґрунтується на поєднанні бета-лактамного антибіотику зі звичайним інгібітором бета-лактамаз у спробі відновити повний терапевтичний потенціал лікарського засобу. Справді, незворотні інгібітори, такі як клавуланова кислота, сульбактам та тазобактам, — є сучасними інструментами в області пригнічення дії бета-лактамаз. У поєднанні з пеніцилінами або цефалоспоринами вони демонструють значуще більшу ефективність та ширину спектру антимікробної активності у поєднанні з безпечністю, яка характерна для бета-лактамних антибіотиків [16]. Сульбактам — це інгібітор бета-лактамаз, подібний за структурою до клавуланової кислоти [13]. Якщо відповідний інгібітор присутній у місці інфекції, він нейтралізує ферменти бета-лактамази, а, отже, препарат, що використовується в комбінації з інгібітором, отримує можливість пригнічувати ріст бактерій [3].



Мета дослідження

Побачити, чи комбінація сульбактаму з цефтриаксоном потенціє антибактеріальну активність проти *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* та *Klebsiella pneumoniae*.

Матеріали та методи досліджень

Бактеріальні штами. Наступні штами, отримані у Центрі колекцій мікробних штамів Інституту мікробної технології, Чандігарх, Індія, використовувалися для даного дослідження — *Escherichia coli* (MTCC - 1687), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC- 1688), *Staphylococcus aureus* (MTCC - 737), *Bacillus subtilis* (MTCC - 736) та *Klebsiella pneumoniae* (MTCC - 109).

Антибіотик. Сульбактомакс (комбінація фіксованих доз цефтриаксону і сульбактаму у співвідношенні 2:1) та цефтриаксон, що використовувалися у дослідженні, були надані для вивчення виробником («Венус Ремедіс Лімітед», Індія).

Середовище. Для тесту на чутливість та визначення кривої залежності мікробного навантаження від часу використовували бульйон Мюллера-Хінтона (МН), збагачений кальцієм (25 мг/л) і магнієм (12,5 мг/л). Підрахунок колоній здійснювали в чашках з агаром Мюллера-Хінтона.

Аналіз на чутливість. МПК Сульбактомаксу та Цефтриаксону для п'яти штамів визначалися у катіон-збагаченому бульйоні Мюллера-Хінтона за допомогою техніки мікророзведень [2, 17]. Нічні культури бульйону Мюллера-Хінтона використовувались для підготовки інокуляту 10^5 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Мінімальна пригнічуюча концентрація (МПК) визначалися як найменша концентрація протимікробного засобу, що запобігала мутності через 24 години інкубації при 37 °С.

Дослідження кривої залежності мікробного навантаження від часу

Для кожного штаму проводилось дослідження кривої залежності мікробного навантаження від часу у скляних флаконах в бульйоні Мюллера-Хінтона з використанням інокуляту 5×10^6 – 1×10^7 КУО/мл та цефтриаксону або Сульбактомаксу [11]. Флакон з інокульованим бульйоном Мюллера-Хінтона без додавання антибіотику служив в якості контрольного розчину. Кількість бактерій, що вижили, підраховували через 0, 3, 6 і 12 годин інкубації при 37 °С шляхом пересіву 50-мл серійних розведень (в 0,9 % розчині хлориду натрію) на тарілках з бульйоном Мюллера-Хінтона методом спіралі Платера.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження чутливості: МПК для всіх досліджуваних штамів мікроорганізмів продемонстрували достовірне зниження при використанні Сульбактомаксу у порівнянні з Цефтриаксоном (Таблиця 1).

МПК Сульбактомаксу для *E. coli* становила 0,0625 мг/л, тоді як Цефтриаксон показав значення МПК 0,25 мг/л. У випадку штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*, значення МПК були 1 мг/л для Сульбактомаксу та 2 мг/л для

Таблиця
МПК Сульбактомаксу та Цефтриаксону

№ п/п	Мікроорганізм	МПК Сульбактомаксу (мг/л)	МПК Цефтриаксону (мг/л)
1.	<i>E. coli</i>	0,0625	0,25
2.	<i>P. aeruginosa</i>	1	2
3.	<i>S. aureus</i>	1	2
4.	<i>B. subtilis</i>	8	32
5.	<i>K. pneumoniae</i>	2	16

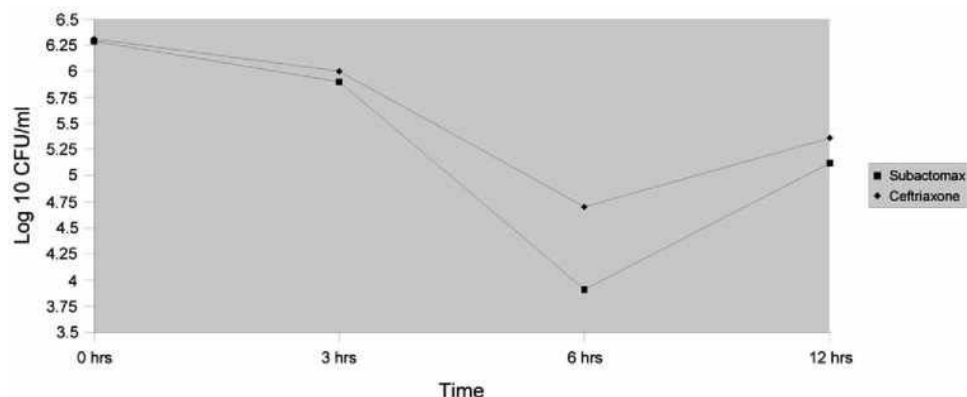


Рис. 1. Крива залежності мікробного навантаження Сульбактомаксу від часу в порівнянні з кривою Цефтриаксону для *E. coli*

Пояснення: по вертикалі – Log 10 КУО/мл; по горизонталі – час; крива позначена квадратами – Сульбактомакс; крива позначена ромбами – Цефтриаксон

Цефтриаксону. Виявлене достовірне зниження значення МПК: від 32 мг/л Цефтриаксону до 8 мг/л Сульбактомаксу для *Bacillus subtilis*, та від 16 мг/л Цефтриаксону до 2 мг/л Сульбактомаксу для *Klebsiella pneumoniae*.

Дослідження кривої залежності мікробного навантаження від часу: бактерицидний ефект при використанні доз Сульбактомаксу та Цефтриаксону, о вдвічі перевищували МПК, досягався щонайшвидше через 2 години. Рівень бактерицидної дії у Сульбактомаксу був помітно вище через 6 годин у порівнянні з дією Цефтриаксону.

У штаму *E. coli* дослідження кривої залежності мікробного навантаження від часу про-

дemonструвало бактерицидний фект від 6,31 до 4,7 log₁₀ КУО/мл через 6 годин для Цефтриаксону, та від 6,29 до 3,91 log₁₀ КУО/мл для Сульбактомаксу (рис. 1). Цефтриаксон знищував 4,95 log₁₀ КУО/мл, 4,9 log₁₀ КУО/мл, 5,40 log₁₀ КУО/мл і 5,43 log₁₀ КУО/мл бактерій через 6 годин для *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* та *K. Pneumoniae* відповідно. При дослідженні Сульбактомаксу для цих штамів бактерій через 6 годин показники мікробного навантаження становили 4,85 log₁₀ КУО/мл, 4,48 log₁₀ КУО/мл, 5,08 log₁₀ КУО/мл і 4,93 log₁₀ КУО/мл відповідно (рис. 2, 3, 4, 5).

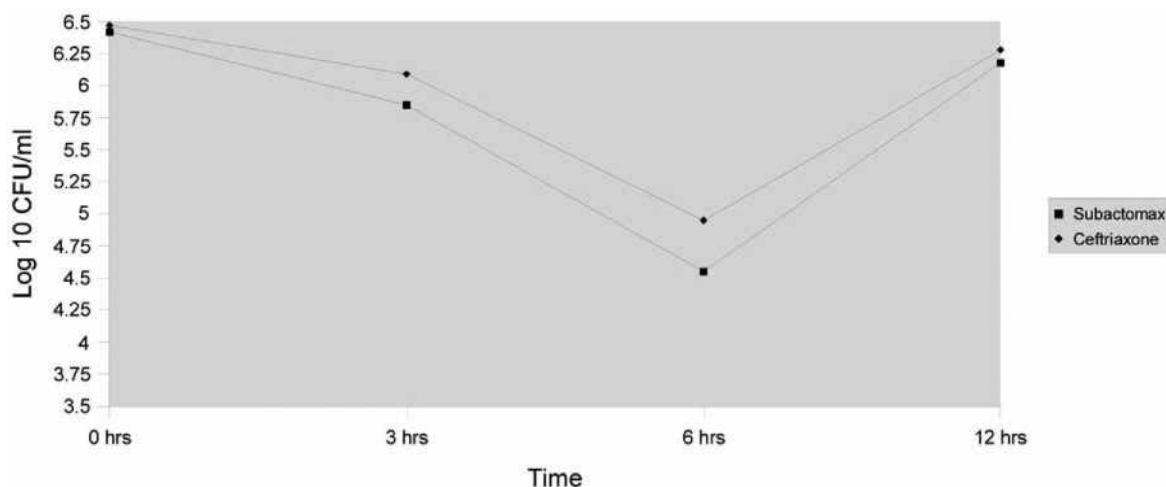


Рис. 2. Крива залежності мікробного навантаження Сульбактомаксу від часу в порівнянні з кривою Цефтриаксону для *P. aeruginosa*.

Пояснення: по вертикалі – Log₁₀ КУО/мл; по горизонталі – час; крива позначена квадратами – Сульбактомакс; крива позначена ромбами – Цефтриаксон

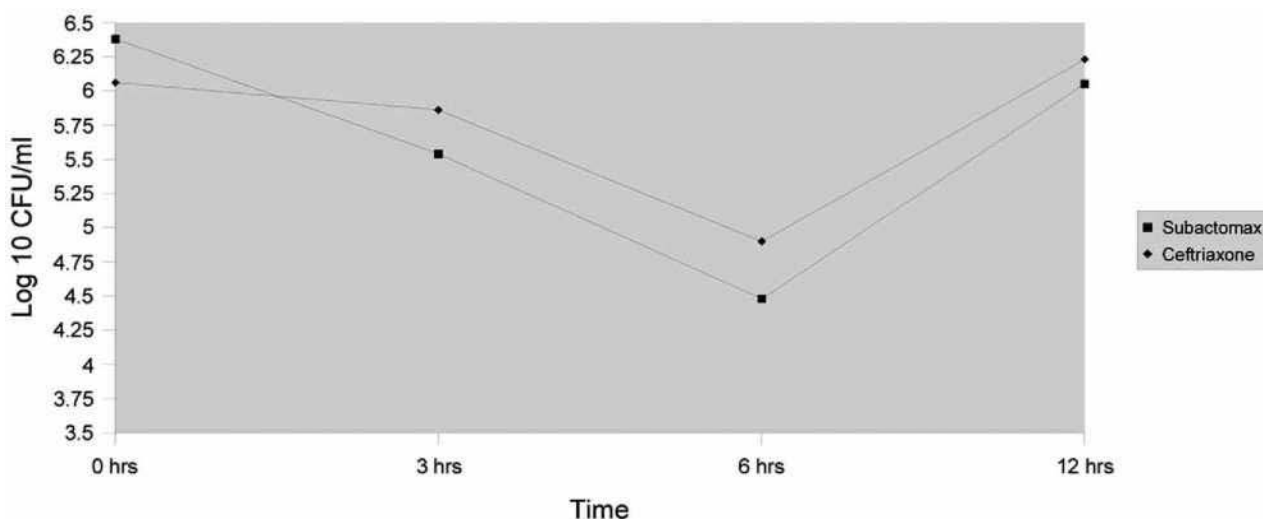


Рис. 3. Крива залежності мікробного навантаження Сульбактомаксу від часу в порівнянні з кривою Цефтриаксону для *S. aureus*.

Пояснення: по вертикалі – Log₁₀ КУО/мл; по горизонталі – час; крива позначена квадратами – Сульбактомакс; крива позначена ромбами – Цефтриаксон

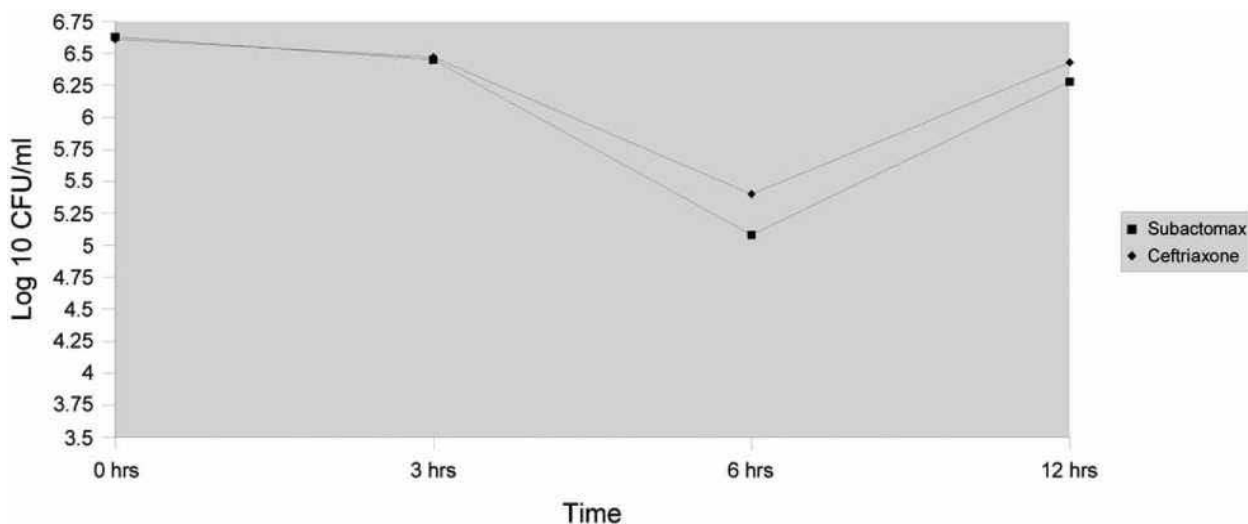


Рис. 4. Крива залежності мікробного навантаження Сульбактомаксу від часу в порівнянні з кривою Цефтриаксону для *B. subtilis*

Пояснення: по вертикалі – Log10 КУО/мл; по горизонталі – час; крива позначена квадратами – Сульбактомакс; крива позначена ромбами – Цефтриаксон

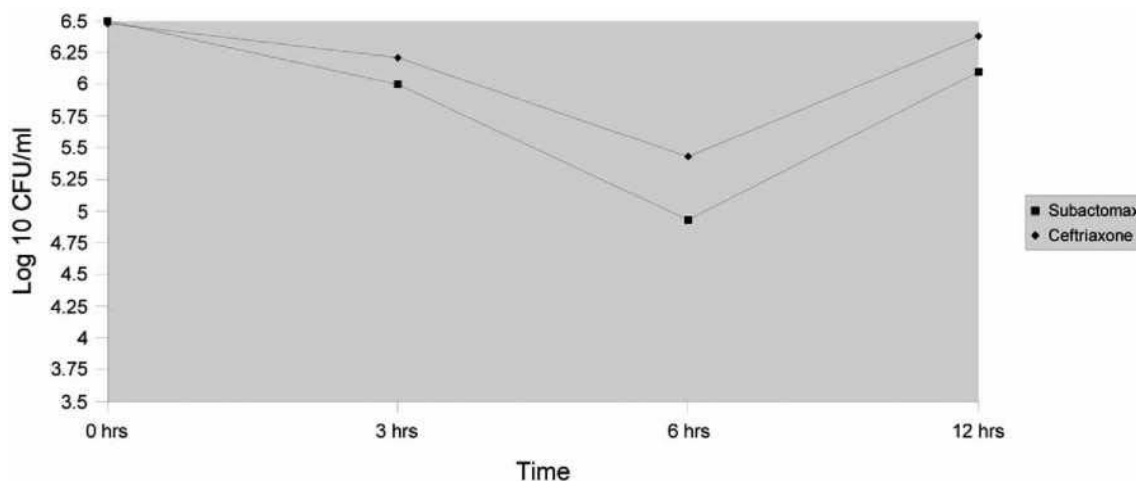


Рис. 5. Крива залежності мікробного навантаження Сульбактомаксу від часу в порівнянні з кривою Цефтриаксону для *K. pneumoniae*.

Пояснення: по вертикалі – Log10 КУО/мл; по горизонталі – час; крива позначена квадратами – Сульбактомакс; крива позначена ромбами – Цефтриаксон

Цефтриаксон — це сполука, що має виражену бактерицидну активність як проти грамнегативних, так і проти грампозитивних бактерій, зокрема клінічно значущих патогенів. Дані дослідження чутливості показали, що цефтриаксон має вищі показники МПК ніж Сульбактомакс, що дає можливість припускати порівняно більш високу бактерицидну активність препарату Сульбактомакс. Це було підтверджено аналізом кривої залежності мікробного навантаження від часу, який показав, що Сульбактомакс має кращу бактерицидну активність, ніж цефтриаксон, навіть при подвійній концентрації по даним МПК

через 12 годин. Дійсно, для всіх досліджуваних організмів Сульбактомакс продемонстрував аналогічну картину бактерицидної активності порівняно з Цефтриаксоном стосовно всіх мікроорганізмів, що використовувались у дослідженні.

Цефалоспорицини мають достовірні та значущі переваги у порівнянні з іншими нетрадиційними бета-лактамами антибіотиками широкого спектру дії [5, 6, 7, 10]. На додачу деякі цефалоспорицини мають спорідненість до основних хромосомно-опосередкованих бета-лактамаз, а, отже, менше підлягають впливу негідролітичних бар'єрних механізмів



мів опору цих бактерій. Поєднання бета-лактаманного антибіотику та інгібітора бета лактамаз продемонструвало кращу бактерицидну активність [1].

Сульбактам, будучи інгібітором бета-лактамази, має також незначний терапевтичний потенціал [9]. Активність комбінації бета-лактаманних антибіотиків і інгібіторів бета лактамаз впливає майже виключно з компоненту сульбактаму [11, 12]. Використання комбінації Цефтриаксону і Сульбактаму в продукті Сульбактомакс проти інфекцій спричинених *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* та *K. pneumoniae* може забезпечити

більший терапевтичний ефект, ніж монотерапія Цефтриаксоном.

В цілому, результати досліджень МПК та кривої залежності мікробного навантаження від часу схожі для *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* та *K. pneumoniae*. Сульбактомакс показав кращу бактерицидну дію на мікроорганізми, ніж монотерапія цефтриаксоном.

Подяка

Автори вдячні відділам роботи зі споживачами та внутрішніх операцій компанії «Венус Ремедіс Лімітед» за надання зразків Сульбактомаксу і Цефтриаксону для цього дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Affinity of cephalosporins for β -lactamases as a factor in antibacterial efficacy / D. J. Phelps, D. D. Carlton, C. A. Farrell, R. E. Kessler // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1986. — N 29. — P. 845-884.
2. Amsterdam D. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, In: Lorian V. (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. — 1996. — P. 52-111.
3. Barry A. L. Criteria for disk susceptibility tests and quality control guidelines for the cefoperazone-sulbactam combination / A. L. Barry, R. N. Jones // *J. Clin. Microbiol.* — 1988. — N 26(1). — P. 13-17.
4. Bush K. Excitement in the β -lactamase arena / K. Bush // *J Antimicrobial Chemother.* — 1998. — Vol. 24. — P. 831.
5. Clarke AM, Zemcov SJV, Wright JM. HR-810 and BMV-28142 two new cephalosporins with broad spectrum activity: an in-vitro comparison with other beta-lactam antibiotics / A. M. Clarke, S. J. V. Zemcov, J. M. Wright // *J. Antimicrob Chemother.* — 1985. — N 15. — P. 305-310.
6. Comparison of a new cephalosporin, BMV 28142, with other broad - spectrum β -lactam antibiotics / R. E. Kessler, M. Bies, R. E. Buck [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1985. — Vol. 27. — P. 207-216.
7. Comparative evaluation of microbial efficacy of Potentox, a fixed dose combination of cefepime amikacin with cefepime and amkacin alone/ S. M. Shrivastava, S. Saurabh, D. Rai, M. Chaudhary // *J. Natcon.* — 2008. — N 20 (1). — P. 121-126.
8. Donowitz G. R. β lactam antibiotics. (second of two parts) / G.R Donowitz, G. L. Masndell // *N Engl J Med.* — 1998. — Vol. 310. — P. 490.
9. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii* / X. Corbella, J. Ariza, C. Ardanuy [et al.] // *J. Antimicrob Chemother.* — 1988. — Vol. 42. — P. 793-802.
10. In vitro activity of BMV 28142 in comparison with those of other β -lactam anti microbial agents / A. Tsuji, A. Maniatis, M. A. Bertram, L. S. Young // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1985. Vol. 27. — P. 515-519.
11. In vitro activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains / P. G. Higgins, H. Wisplinghoff, D. Stefanik, H. Seifert // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2004. — Vol. 48. — P. 1586-1592.
12. Levin A. S. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem / A. S. Levin // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2002. — Vol. 8. — P. 144-153
13. Levy S. B. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora / S. B. Levy, B. Marshall, S. Schluederberg // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1988. — Vol. 31. — P. 1801-1806.
14. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital / Brinas L, Lantero M, de Diego I [et al.] // *J. Antimicrob Chemother.* — 2005. — N 56 (6). — P. 1107-1110.
15. Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations / R. D. Pearson, R. T. Steigbigel, H. T. Davis, S. W. Chapman // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1980. — N 18. — P. 699-708.
16. Moellering R. C. Jr. Meeting the challenges of β -lactamases / R. C. Jr. Moellering // *J. Antimicrob Chemother.* — 1993. — N 31(suppl A). — P. 1-8.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 1997.
18. Philippon A. Extended spectrum β -lactamases / A. Philippon, R. Labia, G. Jacoby // *Antimicrob Agents Chemother.* — 1989. — Vol. 33. — P. 1131.
19. Prashant Bhatia. Alternative empiric therapy to carbapenems in management of drug resistant gram negative pathogens: a new way to spare carbapenems / Prashant Bhatia // *Research Journal of Infectious Diseases.* — 2015. — Vol. 3. — Art. 2.
20. Rolinson G. N. Evolution of β -Lactamase inhibitors / G. N. Rolinson // *Surg. Gynaecol. Obstet.* — 1991. — Vol. 172. — P. 11-16.
21. Sachin Verma. A retrospective study to evaluate the efficacy of a new antibiotic adjuvant entity (β -lactam/ β -lactamase inhibitor/adjuvant disodium edetate combination) for management of sepsis / Sachin Verma // *Research Journal of Infectious Diseases.* — 2015. — Vol. 3. — Art. 3.
22. Shrestha B., Bhuyan N.R and Sinha B.N. Development And Validation Of A Stability Indicating HPLC Method For Estimation Of Ceftriaxone And Sulbactam In Sterile Powder For Injection / B. Shrestha, N. R. Bhuyan, B. N. Sinha // *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA).* — 2012. — Vol.4, N 4. — P. 1660-1666.



23. Umakant Nagashetty Patil, Kiran Lakkol Jambulingappa. A Combination Strategy of Ceftriaxone, Sulbactam and Disodium Edetate for the Treatment of Multi-Drug Resistant (MDR) Septicaemia: A Retrospective,

Observational Study in Indian Tertiary Care Hospital / Umakant Nagashetty Patil, Kiran Lakkol Jambulingappa // Journal of Clinical and Diagnostic Research.— 2015. — Vol 9(11). — FC29-FC32

ОРИГИНАЛЬНАЯ
КОМБИНАЦИЯ
ФИКСИРОВАННЫХ
ДОЗ ЦЕФТРИАКСОНА
И СУЛЬБАКТАМА:
СРАВНЕНИЯ *IN*
VITRO МИКРОБНОЙ
ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРЕПАРАТА
СУЛЬБАКТОМАКС
И ЦЕФТРИАКСОНА

Санджай Мохан
Шривастава,
Сандип Саурабх,
Дхармендра Рай,
Вивэк Кумар Двиведи,
Ману Чаудхари

Резюме. Микроорганизмы, чувствительные к бета-лактамам, быстро приобретают устойчивость посредством производства микроорганизмами бета-лактамаз. Данное исследование направлено на оценку антимикробной эффективности препарата Сульбактомакс, инновационной комбинации фиксированных доз бета-лактамов антибиотиков Цефтриаксона и ингибитора бета-лактамаз Сульбактама. Эффективность оценивали на основе минимальной подавляющей концентрации (МПК) и анализа кривой зависимости микробной нагрузки от времени для бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumonia*. МПК Сульбактомакса для *E. coli* была 0,0625 мг/л, тогда как цефтриаксон отдельно показал значение МПК 0,25 мг/л. В случае бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* значение минимальной подавляющей концентрации составило 1 мг/л для Сульбактомакса и 2 мг/л для Цефтриаксона. Выявлено достоверное снижение значения МПК от 32 мг/л Цефтриаксон до 8 мг/л Сульбактомакс для бактерий *Bacillus subtilis*, и от 16 мг/л ЦЕФТРИАКСОН до 2 мг/л Сульбактомакс для *Klebsiella pneumonia*.

Во всех исследуемых организмах, анализ кривой зависимости микробной нагрузки от времени продемонстрировал гибель большинства бактерий на 6 часе исследования. Сульбактомакс продемонстрировал лучшую бактерицидную активность, чем отдельно Цефтриаксон.

Также установлено, что Сульбактомакс производит большую бактериально-подавляющую активность по сравнению с монотерапией цефтриаксоном в исследовании *in vitro*.

Ключевые слова: Сульбактомакс, цефтриаксон, МПК, кривая зависимости микробной нагрузки от времени.

THE ORIGINAL FIXED-
DOSE COMBINATION
OF CEFTRIAXONE AND
SULBACTAM: COMPARISON
OF *IN VITRO* MICROBIAL
EFFICACY OF CEFTRIAXONE
AND SULBACTAM

Sanjay Mohan Shrusti,
Sandeep Saurabh,
Dharmendra Rai,
Vivek Kumar Dwivedi,
Manu Chaudhary

Summary. Microorganism susceptible to beta lactam antibiotics are fastly becoming resistant because of production of beta lactamase by microorganisms. This study is aimed at evaluating microbial efficacy of Sulbactomax drug, a novel fixed dose combination of beta lactam antibiotic Ceftriaxone and beta lactamase inhibitor Sulbactam drugs. Efficacy was evaluated on the basis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and time kill curve analysis in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae*. The MIC for Sulbactomax in *E. coli* was 0.0625 mg/l whereas Ceftriaxone alone showed MIC of 0.25 mg/l. In case of *S. aureus* and *P.aeruginosa* MIC were found to be 1 mg/l for Sulbactomax and 2 mg/l for Ceftriaxone. There was significant reduction of MIC values to 8 mg/l of Sulbactomax from 32mg/l of Ceftriaxone in *B. subtilis* and 2mg/l of Sulbactomax from 16mg/l of Ceftriaxone.

In all organisms under study, time-kill curve analysis demonstrated bacterial maximum killing at 6 hours. Sulbactomax demonstrated better bactericidal activity than Ceftriaxone alone.

In conclusion, Sulbactomax was found to have more bacterial inhibiting properties than Ceftriaxone alone in *in vitro* analysis.

Key words: Sulbactomax, ceftriaxone, MIC, time kill curve.