

DESCRIPTION OF METHODOLOGY FOR TESTING THE SYNERGISTIC AND ADDITIVE EFFECTS OF ANTIBIOTICS *IN VITRO*

Paweł Z. Kmieciowski^{1,*}, Aniela Gabriel¹, Dagmara Depka², Tomasz Bogiel^{2*}

¹ Microbiology Student Science Club, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 9 Maria Skłodowska-Curie Street, 85-094 Bydgoszcz, Poland.

² Microbiology Department Ludwik Rydygier, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 9 Maria Skłodowska-Curie Street, 85-094 Bydgoszcz, Poland.

Submitted in August 2024, accepted in November 2024

Abstract. Given the dynamic growth of antibiotic resistance observed over the past few decades, new therapeutic methods for life-threatening infections are crucial. Effective treatment of infections caused by multidrug-resistant microorganisms increasingly requires the use of last resort drugs, and new antibiotics generate resistance in less time than it takes to bring them to the therapy. Therefore it is advisable to seek solutions using currently available antibiotics. Effective therapy of infections with multidrug-resistant microorganisms may be enabled by the use of additive and synergistic interactions, resulting from the combination of different groups of antibiotics with the same or different modes of action – including those to which a particular bacterial strain is resistant. This paper describes methods for determining the synergistic and additive effects of antibiotics *in vitro*, including the CombiANT method under testing. The purpose of this study is to present possible methods for determining the additive and synergistic effects between antibiotics *in vitro* and to propose appropriate laboratory procedures for their use. This paper reviews the latest literature on methods for determining the antimicrobials interactions. Clinical studies indicate significant benefits of using the phenomenon of antibiotic addition or synergy in clinical practice, not only improving the effectiveness of therapy, but also minimizing side effects and reducing the risk of developing *de novo* antibiotic resistance. Despite the significant problem of increasing antibiotic resistance level, clinical practice still lacks clearly standardized methods for determining synergism. Further research is needed to determine the most beneficial standard available for a wide range of microbiology diagnostic facilities.

1. Introduction. 2. Methodology of literature search and selection. 3. Method based on antibiotics microdilution series in broth medium. 4. “Time-kill” test. 5. CombiANT test. 6. Strips impregnated with antibiotic gradient used in methodology for determining antimicrobials synergistic effect. 7. Alternative methods for the determination of synergistic and additive antibiotic activity. 8. Conclusions

Keywords: antibiotic resistance, antibiotic synergism, checkerboard test, time-kill test

1. Introduction

The epidemiological transformation in the early 20th century involved a shift from infectious diseases to non-infectious diseases as the leading causes of death worldwide. It became a source of hope for the ultimate victory of medicine over infections, facilitated by the discovery of many antibiotics in the 1940s and 1950s. Unfortunately, after only a few decades, due to the rapid growth of antibiotic resistance, infectious diseases have once again become one of the greatest threats to public health. Scientists such as Venkatasubramanian Ramasubramanian, president of the Clinical Infectious

Disease Society of India, have been warning of a new post-antibiotic era for some time now (Sayburn 2023).

In addition to the significant rate of development of global antibiotic resistance, a critical aspect of the treatment of infections is the epidemiological situation in Poland, compared to Europe. For example, in 2021, fluoroquinolones-resistant *Escherichia coli* isolates accounted for 33.1% of *E. coli* isolates in Poland (population-weighted European average: 21.9%), carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates for 19.5% (population-weighted European average: 11.7%), and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates for 34.3% (population-weighted European average: 17.2%).

* Corresponding Authors: Paweł Z. Kmieciowski, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologii przy Katedrze Mikrobiologii, Tomasz Bogiel Katedra Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kmieciowski.pawel@gmail.com, t.bogiel@cm.umk.pl

© 2024 Paweł Z. Kmieciowski et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Description of methodology for testing the synergistic and additive effects of antibiotics *in vitro*. Kmieciowski P.Z. *et al.*, ADV MICROBIOL-NY, 2024, 63, 4, 199–222, <https://doi.org/10.2478/am-2024-0000>

More than half of the isolated *K. pneumoniae* strains showed multidrug resistance (MDR), which in this case meant resistance simultaneously to aminoglycosides, fluoroquinolones and third-generation cephalosporins (Żabicka and Grzegorzczak 2022). A significant difference between the degree of antibiotic resistance in Poland and Western and Northern European countries is also of great concern. In 2022, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains accounted for 76.4% of isolates in Poland, compared with only 3.5% in Germany and France and 2.7% in Sweden (European Center for Disease Prevention and Control).

The stagnation of the pharmaceutical market further hampers the effective treatment of infections. From 2017 to 2022, only 12 new antibiotics have been approved, and only two of them – vaborbactam and lefamulin – are representatives of new drug groups. A significant constraint and challenge of new antimicrobials introduction is the cost of bringing new therapeutics to market and the need for some of the latest agents to be seen as drugs of last resort. In most cases, resistance to new drugs is already reported within 2–3 years of their initial application (WHO 2021).

Although research is ongoing on new antibacterial agents and strategies, such as monoclonal antibodies or bacteriophages (WHO 2021), in light of such a dynamic development of the phenomenon of antibiotic resistance, it is necessary to search for new forms of treatment, including also these using already available antibiotics. A promising infection treatment method combines antibiotics with different mechanisms of action in therapy, including antibiotics to which bacteria were resistant in monotherapy. Their additive or synergistic action may allow them to reduce the value of their minimal inhibitory concentrations (MICs) or even break the barrier of resistance of a strain to particular drugs. Additional advantages of achieving a synergistic effect of a combined antibiotics approach include maximizing treatment effects with a reduced risk of developing *de novo* antibiotic resistance and possibly using lower drug doses (Garbusińska and Szliszka 2017). It is worth recalling that combined antimicrobial therapy is almost as old as antibiotic therapy itself, as evident in the history of the treatment of infections caused by *Mycobacterium tuberculosis*, in which the association of streptomycin with other drugs began soon after its discovery. Indeed, it was found that after the several months course of tuberculosis pharmacotherapy, the probability of developing resistance to streptomycin used in monotherapy could be as high as 100% (Brennan-Krohn and Kirby 2019a).

Several methods are currently used to study the additive and synergistic effects of antibiotics: e.g. methods based on strips impregnated with antibiotics in a concentration gradient, antimicrobials disc diffusion methods,

antimicrobials micro-dilutions in agar methods, the checkerboard method, “time-kill” test, *in vitro* dynamic pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK/PD) models, semi-mechanistic PK/PD models, and even *in vivo* animal models (Karakonstantis *et al.* 2022). This article characterizes and describes the step-by-step methodology of several of the methods mentioned above, which, in the authors’ opinion, have the most significant potential for use in daily laboratory and clinical practice as routine methods for testing antibiotic combinations, which in the future may contribute to improving the clinical condition of many patients suffering from infections caused by multi-drug-resistant bacterial strains.

2. Methodology of literature search and selection

PubMed and Google Scholar databases were used for the literature review, searching for the phrases: antibiotic resistance, antibiotic synergism, antibiotic interaction methodology, antibiotic FICI assessing, checkerboard assay, “time-kill” curves, synergism disc-based methods, synergism gradient-based methods, antibiotic gradient-based methods from the last 10 years. Among the results obtained, articles on antibiotic combinations were selected, including descriptions of the most commonly used methods for testing synergism and antibiotic adherence in substantive, clinical and/or procedural terms. Information on the epidemiology of antibiotic resistance was obtained from the Surveillance Atlas of Infectious Diseases of the European Centre for Disease Prevention and Control.

3. Method based on antibiotics microdilution series in broth medium

The microdilution method (so-called “checkerboard test”) is the most popular method for testing the *in vitro* activity of antibiotic combinations, a modification of the standard method for determining MIC in broth, a technique routinely used, for example, in assessing the MIC value of colistin. Most often, a 96-well polystyrene plate is used. It is adapted to test the simultaneous activity of two antibiotics in each well – antibiotic concentrations are placed onto the plate, creating a gradient “checkerboard” of dilutions of the two antimicrobials so that every possible combination of the two concentrations of the test drugs is evaluated within the chosen and planned concentration ranges. This method has two severe limitations. First, it is a static method in which the effect of antibiotics is assessed at a specific point in time without the possibility of being evaluated for several hours of incubation. It provides information only on the bacteriostatic effect without the possibility

of testing the killing properties of drugs (in the methodology used, these two effects are indistinguishable) (Brennan-Krohn and Kirby 2019a). Limiting the number of antibiotics tested to two is also essential. With more than that, the method quickly becomes impractical, even assuming that at least one of the drugs will be tested in a relatively narrow range of concentrations (Brennan-Krohn and Kirby 2019a; Doern 2014). In addition, this method requires many reagents, and it is necessary to prepare many antibiotic dilutions.

In the described method, standardized bacterial inocula (of constant density and volume) in Mueller-Hinton broth and antibiotics (usually two from two different groups) in appropriate concentrations are placed in the wells of a polystyrene plate, the concentrations of which can be related to the concentrations achievable in the patient's body fluids and which were obtained in serial two-fold dilutions (Doern 2014; Garbusińska and Szliszka 2017; Brennan-Krohn and Kirby 2019a). After the incubation time, bacterial growth is assessed in all of the wells of the plate. For the wells in which the bacterial growth is inhibited, the fractional inhibitory concentration index (FICI) is calculated and based on this, the antibiotic interaction is classified as antagonistic ($FICI > 4$), neutral ($1 < FICI \leq 4$), additive ($0.5 < FICI \leq 1$) or synergistic ($FICI \leq 0.5$). Although authors of scientific investigation sometimes use other ranges for FICI values interpretation or do not distinguish between antibiotic addition/synergy effects, the cited classification method is the most common. The FICI for a given concentration combination at which inhibition is observed is the sum of the fractional inhibitory concentration (FIC) of both drugs, i.e. the ratio of the drug concentration in that well to its MIC. Thus, since synergism is evidenced by an $FICI \leq 0.5$, and the error range for MIC testing in a standard dilution in broth is ± 1 two-fold dilution (with the error range increasing when testing drugs in combination), the definition of synergism is met if each drug in a well has a concentration of at least half that of its MIC assessed individually in a separate assay (Garbusińska and Szliszka 2017; Brennan-Krohn and Kirby 2019a).

The broth microdilution method continues to be modified and improved, such as using a bio-printer, which allows for precise micro-volume measurements and speeds up the entire procedure (Brennan-Krohn and Kirby 2019b). The procedure described below includes reagents and equipment commonly available in microbiology laboratories.

Procedure

1. Preparation of bacterial inoculum.

- 1.1. Calibrate the densitometer against a control sample with an optical density of 0.5 on the McFarland scale.

- 1.2. Collect the tested strain with a sterile loop from the agar medium and place it in a solution appropriate for the method (usually saline).
- 1.3. Vortex it.
- 1.4. Measure of the optical density of the suspension in a densitometer.
- 1.5. Optionally, add the bacterial mass or the control strain being tested using a loop to an optical density of 0.5 on the McFarland scale.
2. Determination of MICs of the tested antibiotics (method of choice).
3. Preparation of antibiotic solutions.
 - 3.1. Select the antibiotic to be diluted in rows 1–12, i.e. horizontal rows (antibiotic A), and another in wells A→H, i.e. vertical columns (antibiotic B); consider the appropriateness of testing one in a broader range of concentrations.
 - 3.2. Prepare approximately 400 µl of antibiotic A solution and approximately 350 µl of antibiotic B at a concentration four- (for A) and eight- (for B) times higher than the resistance cut-off value of a given drug for the species of the strain being tested (Brennan-Krohn *et al.* 2017; EUCAST 2024). Select the solvent according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines: “Solvents and Diluents for Preparing Stock Solutions of Antimicrobial Agents”. If the guidelines do not contain information on the tested antibiotic, use a solvent that maintains more excellent drug stability (Bellio *et al.* 2021).
 - 3.2.1. It is possible to use the following pattern:

$$C_a - C_k = V_r$$

$$C_k - C_r = V_a$$
 Where:
 - C_a – initial concentration of the antibiotic solution [mg/l],
 - C_k – final concentration of antibiotic solution [mg/l],
 - C_r – solvent concentration [mg/l],
 - V_r – solvent volume [µl],
 - V_a – initial volume of antibiotic solution [µl].
 Adding V_a of the initial antibiotic solution to V_r of the solvent will provide an antibiotic solution with a concentration of C_k . C_k should have a value four times higher than the breakpoint value for resistance to a given drug for the strain of the species tested.
4. Preparation of a concentration checkerboard. (Fig. 1. Broth microdilution method – preparation of a concentration pattern.)
 - 4.1. Add 50 µl of MHB (Mueller-Hinton broth) to all wells in rows 1st to 11th and two wells in row 12th by automatic adjustable pipette. (Fig. 1A. Add Mueller-Hinton broth.)

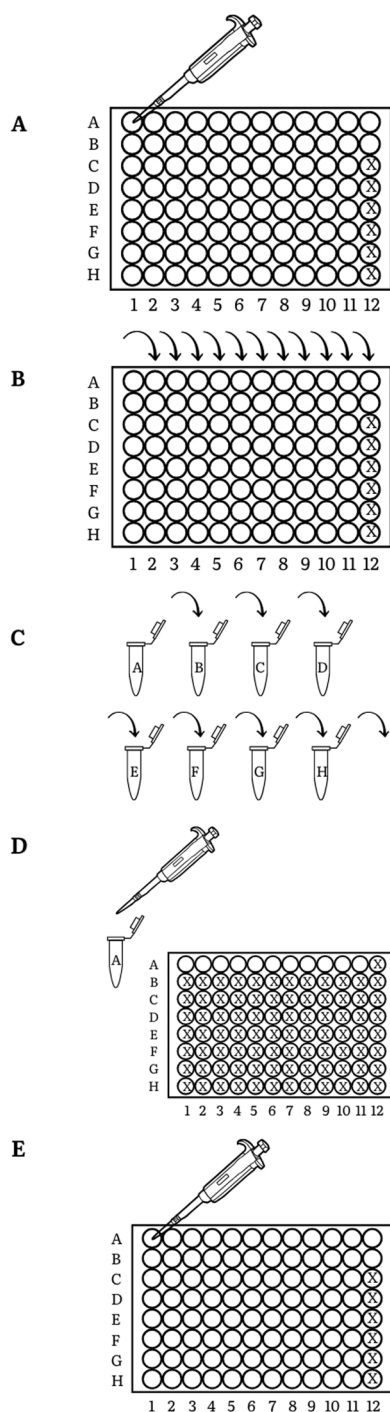


Fig. 1. Broth microdilution method – preparation of a concentration pattern.

- A – add Mueller-Hinton broth.
 B – prepare a series of microdilutions of the first antibiotic.
 C – prepare a series of microdilutions of the second antibiotic.
 D – add antibiotics together.
 E – re-add of Mueller-Hinton broth.
- 4.2. Add 50 μ l of antibiotic A to all wells (A-H) in row 1st.
 - 4.3. With a multi-channel adjustable pipette, transfer 50 μ l of solution from the wells of row 1st to the wells of row 2nd, from row 2nd to row 3rd, and so to row 11th. Mix the resulting solu-

tion each time with an automatic pipette (slowly aspirate and withdraw the solution several times). Transfer 50 μ l of solution from wells 11A and 11B to 12A and 12B. Remove 50 μ l of solution each from wells 11C-H. The well 12A will be a control for bacterial growth without antibiotics (positive control), the well 12B will serve as a procedure sterility control, and also for the remaining reagents and drugs solutions (negative control). (Fig. 1B. Prepare a series of microdilutions of the first antibiotic.)

- 4.4. Prepare 8 Eppendorf tubes (1,5 ml) and label them sequentially with the letters A-H.
- 4.5. Place 1 ml of MHB in all the labelled Eppendorf tubes using an automatic pipette.
- 4.6. Transfer 333 μ l of antibiotic B solution (with a concentration of eight times the resistance breakpoint of the applied drug for the strains of the tested species) into the Eppendorf tube A. After placing antibiotic B in MHB at a ratio of 1:3, its solution with a concentration twice higher than the resistance breakpoint concentration of the drug will be obtained.
- 4.7. Transfer the volume of 333 μ l from the Eppendorf tube A to the Eppendorf tube B and mix with an automatic pipette. Transfer 333 μ l from the Eppendorf tube B to the Eppendorf tube C, mix and so on to the Eppendorf tube H. Remove 333 μ l of solution from the Eppendorf tube H. (Fig. 1C. Prepare a series of microdilutions of the second antibiotic.)
- 4.8. Pipette 50 μ l of solution from the Eppendorf tube A into wells of A row (A1-A11 – excluding well A12 – serving as a positive control), from the Eppendorf tube B into all wells in B row (B1-B12), from the Eppendorf tube C into wells C1-C11, and so on. (Fig. 1D. Add antibiotics together.)
- 4.9. Pipette (multi-channel pipette can be used) 50 μ l of MHB into each well of the antimicrobials dilutions. Avoid adding MHB to the 12C-H wells when using the multi-channel pipette. (Fig. 1E. Re-add Mueller-Hinton broth.)
- 4.10. Add 50 μ l of bacterial suspension to each well with antimicrobials solutions (except 12B – as a negative control).
5. Incubate for 16–24 hours at 37°C.
6. Bacterial growth assessment.
 - 6.1. Assess turbidity in the wells after incubation. The absence of turbidity indicates that the antibiotics inhibit bacterial growth.
 - 6.2. Record/capture in which antimicrobials concentration combinations growth inhibition is observed. For these combinations, FICI calculation is necessary, as follows:

$$\begin{aligned} FICI &= FIC_x + FIC_y \\ FIC_x &= MIC_{xc} / MIC_x \\ FIC_y &= MIC_{yc} / MIC_y \end{aligned}$$

Where:

MIC_x , MIC_y – MIC of drug X or Y used alone,
 MIC_{xc} , MIC_{yc} – drug X or Y concentration in combination in a given well for which FICI is determined (Garbusińska i Szliszka 2017).

- 6.3. Interpret the FICI values according to the criteria given above and classify the particular antimicrobials concentrations combination as synergistic, additive, neutral or antagonistic.
- 6.4. If a so-called “skipped well” occurred in a row (e.g. no growth in well C8, while growth in C9, no growth in C10), the FICI for C10 was calculated to avoid misinterpretation, i.e. a false positive result (Brennan-Krohn *et al.* 2017).

4. “Time-kill” test

The “time-kill” test is a microbiological method which provides information on both the synergistic effect of antibiotics and the kinetics of bacterial growth and activity of the bactericidal preparation (Brennan-Krohn and Kirby 2019b). The test is based on the analysis of microbial survival in prepared concentrations of two antibiotics at selected time intervals. The interaction of the two drugs is determined by comparing the CFU/ml value (colony-forming unit per ml) between the tested combination of antibiotics and the best-performing single antibiotic. The obtained results are presented on the “time-kill” curves. Synergism is established when the difference between the two trials exceeds $\geq 2_{\log 10}$ (Brennan-Krohn and Kirby 2019b). A particular combination is considered bactericidal when the difference in CFU/ml between the combination of two antibiotics at the start of incubation and after 24 hours is $\geq 3_{\log 10}$. The “time-kill” test is an alternative to the checkerboard assay (Garbusińska and Szliszka 2017).

Its decisive advantage is the ability to determine both the bacteriostatic and bactericidal action (as opposed to the checkerboard assay, which can evaluate only the bacteriostatic action). In addition, the “time-kill” test makes it possible to determine the action of a combination of antibiotics at different time points (Brennan-Krohn and Kirby 2019b). The disadvantage of the “time-kill” test is that it is more labor-intensive and time-consuming compared to the checkerboard assay. In addition, the “time-kill” test is much more expensive.

Procedure

1. Preparation of antibiotic solutions.

- 1.1. Determination of the antimicrobial agent concentration based on its solubility and the desired

final concentration. The solvent selection should follow the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines.

2. Initiation of pre-culture.

- 2.1. Prepare a 0.5 McFarland suspension in 0.9% NaCl from an overnight culture. Adjust the bacterial concentration with a densitometer to obtain a turbidity of 0.5 on a McFarland scale.
- 2.2. Add 100 μ l of the bacterial suspension to 5 ml of CAMBH (Mueller-Hinton Broth, cation adjusted). Transfer a drop of the diluted suspension via a sterile inoculating loop on a blood agar plate to confirm the purity of the inoculum. The incubation of the control culture is recommended at 35°C
- 2.3. Incubate the remaining suspension at 35°C for at least 3 hours until logarithmic growth is achieved.

3. Antimicrobial solutions.

- 3.1. Add 10 ml of CAMBH to 5 glass culture tubes.
 Tube 1: Add the first antibiotic in an amount corresponding to the target antibiotic concentration.
 Tube 2: Add the second antibiotic in an amount corresponding to the target antibiotic concentration.
 Tube 3: Add the same amount of the first and the second antibiotic as in tubes 1 and 2.
 Tube 4: Growth control – do not add antibiotics.
 Tube 5: Negative control – neither antibiotic nor microorganism should be added.

4. Perform a series of dilutions.

(Fig. 2. The “time-kill” method – a series of dilutions.)

- 4.1. Prepare six 96-well plates (labelled: t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) with 2 ml wells which will be used for a series of dilutions. Place 900 μ l of 0.9% NaCl in rows B-H, columns 1st-5th. (Fig. 2A Prepare six 96-well plates (t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) with 0.9% NaCl.)
- 4.2. Transfer the culture in the logarithmic growth phase of the initial inoculum. Transfer 1 ml of suspension to a culture glass tube. To obtain a density of 1.0 McFarland use CAMBH to adjust – dilute, or add more microbial cells to concentrate the suspension.
- 4.3. Add 100 μ l of the suspension to tubes 1st–4th and mix gently. (Fig. 2B. Add the bacterial suspension to test tubes 1st–4th.)
- 4.4. Withdraw 150 μ l from each tube at time t_0 (immediately after adding the bacterial suspension) and after 1, 2, 4, 6 and 24 hours. Add portions to wells in appropriately marked rows 1 (t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) of the 96-well plates. (Fig. 2C. Transfer the suspension portion to the appropriate plate a predetermined times.)

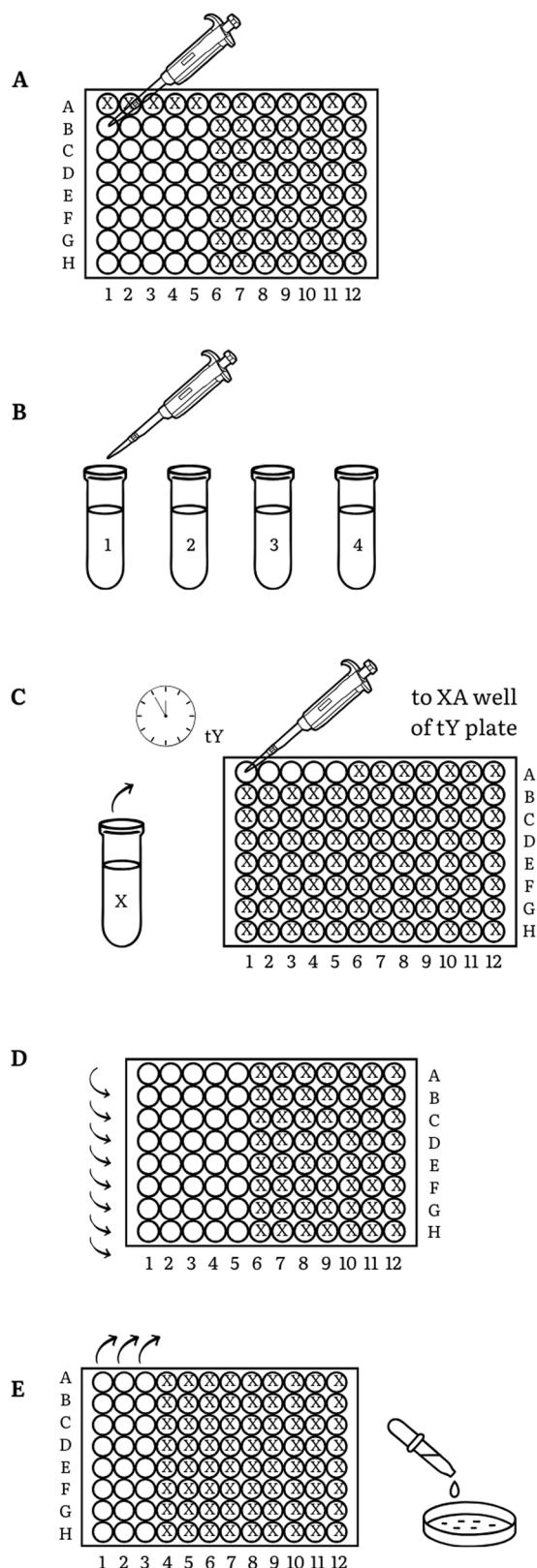


Fig. 2. The "time-kill" method – a series of dilutions.

- A – prepare six 96-well plates (t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) with 0.9% NaCl
 B – add the bacterial suspension to test tubes 1st–4th.
 C – transfer the suspension portion to the appropriate plate at predetermined times.
 D – obtain a dilution of 1:10.
 E – transfer a portion of the suspension to the plates using the "drop plate" method.

- 4.5. Using a multi-channel pipette, withdraw 100 μ l volume from row A and transfer it to row B. Aspirate and withdraw the solution several times to mix evenly. This action will result in a dilution of 1:10. Repeat for rows B–H. Remove 100 μ l from row H. (Fig. 2D. Obtain a dilution of 1:10.)
 4.6. Using a multi-channel pipette, collect 10 μ l from each well in columns 1st–3rd of all plates and transfer to appropriately labelled Mueller-Hinton agar plates for colony counting using the "drop plate" method. The labelling pattern should allow for identification of the antibiotics used, their concentrations, and the time after which a portion of the bacterial suspension was transferred to the plate (t_0 – t_{24}). Allow the drop to dry completely. (Fig. 2E. Transfer a portion of the suspension to the plates using the "drop plate" method.)
 4.7. Place a 10 μ l drop from the negative control to the selected plate after 24 hours to confirm procedure sterility. Invert the plate and incubate overnight under recommended conditions.

5. Reading the results.

- 5.1. Negative control check. If any growth is observed, the results are unreliable.
 5.2. The colonies obtained should have the uniform morphology expected for the strain used.
 5.3. Identify drops with 3–30 colonies for each series of dilutions. Count the colonies in these drops and record them along with the dilution factor. If there are no drops with 3–30 colonies in the dilution series, count the last drop with more than 30 and the first with colonies.
 5.4. Calculate the CFU/ml value in the sample for each dilution series based on the number of colonies in the drop using the formula:

$$\text{CFU/ml} = 100 \cdot n/d$$

Where:

- n – number of colonies,
 d – dilution factor (1 for undiluted sample
 – row A, while 0,1 for the first dilution
 – row B, 0,01 for the second dilution
 – row C, etc.).

6. Analysis of results.

- 6.1. Plot the corresponding growth curves from three cultures containing antibiotics and control growth, using time units on the x-axis and CFU/ml values on the y-axis.
 6.2. Calculate the difference between growth in the tube with no antibiotics after 24 hours and the most active single factor simultaneously (in CFU/ml). The combination is considered syn-

ergistic if the difference is $\geq 2 \log_{10}$. Calculate the difference in CFU/ml between the combination in the tube at 24 hours and at time 0 point. Consider the combination bactericidal if the difference is $\geq 3 \log_{10}$.

5. CombiANT test

Another method for testing antibiotic combinations, CombiANT, is not yet available in research practice or microbiological diagnostics. It was first presented in 2020, and initial studies indicate identical results of the CombiANT technique compared to the checkerboard assay (Fatsis-Kavalopoulos *et al.* 2020). Despite the lack of equipment and algorithms for validated results interpretation for individual bacterial species, due to the many advantages of this method and perhaps a breakthrough in the facilitation of testing antibiotic combinations, the decision was made to describe this procedure in detail in this paper.

CombiANT is a diffusion-based assay providing quantitative information on the interactions of three pairs of antibiotics. The selected antibiotics are placed in three reservoirs and then in a standard agar plate. Two fields can be distinguished. On the outside of the insert is a field where each antibiotic acts individually. Inside the antibiotic plate is a triangular field where the interaction between the individual antibiotic pairs occurs. The results are generated by an algorithm developed by the creators, calibrated to the type and rate of diffusion of each antibiotic in the chosen substrate. The extent of antibiotic interaction is determined quantitatively based on points at the edge of the inhibition zone, according to the FICI formula. The FICI values were interpreted according to clinical thresholds, where ≤ 0.5 indicates antimicrobials synergy, $\text{FICI} > 0.5$ and ≤ 4 indicates addition, while > 4 indicates antagonism (Tang *et al.* 2024).

The CombiANT method can be used without determining the strain's susceptibility to a given antibiotic. This fact is a definitive advantage, as it reduces the waiting time for the antimicrobial sensitivity result of the tested strain. The CombiANT test has the same accuracy as the broth microdilution method but is more efficient and less complex (Fatsis-Kavalopoulos *et al.* 2020). An additional advantage of this method is the possibility of accurately determining the inhibitor concentration since a continuous range of antibiotic concentrations is used. In contrast, the checkerboard assay has only 2-fold antimicrobials dilutions. A significant disadvantage of this method is the need to purchase special inserts, which do not have laboratory applications for other studies.

Procedure (Fig. 3. CombiANT method – the insert and experimental protocol.)

1. Preparation of the antibiotic insert (Fig. 3A. The insert design: antibiotic reservoirs (a-c), interaction imaging area (d)).

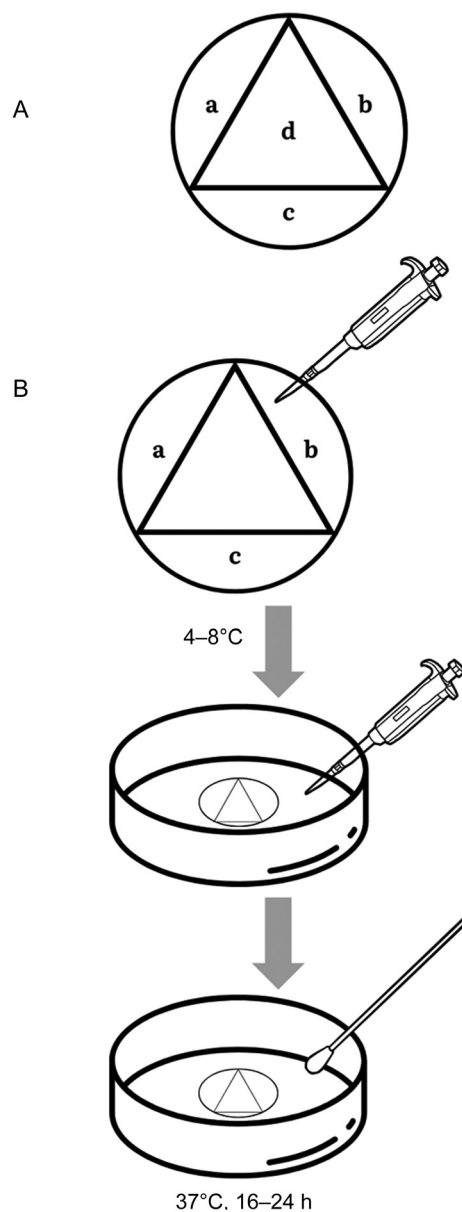


Fig. 3. CombiANT method – the insert and experimental protocol. A – the insert design: antibiotic reservoirs (a-c), interaction imaging area (d).

B – the assay protocol: „The insert is loaded by adding 0.5 mL liquid agar (60°C) containing antibiotics into the reservoirs. The prepared inserts can be stored at 4–8°C. To activate an insert, add a second layer of 25 mL agar to enclose the insert and fill the plate, thereby permitting diffusion of the antibiotics to the agar surface and the reservoir periphery. After solidification, a bacterial cell suspension of 0.5 McFarland is inoculated on the agar surface using a sterile cotton swab and exposed to the antibiotic gradient landscape. The finished plates are incubated at 37°C, and stable zones of growth inhibition are established within 16–24 hours.” (Fatsis-Kavalopoulos *et al.* 2020)

- 1.1. Add 0.5 ml of liquid agar medium to each of the reservoirs (at 60°C) containing previously added antibiotics (labelled A, B, and C, respectively). The antibiotic concentration is calculated based on the result of the calibration of the analytical algorithm (Fig. 3B). Preparation for digital imaging. Inactivated plates can be stored at 4–8°C for 7 days.
- 1.2. Applying the insert to the culture plate and adding a second agar layer activate the insert. This will allow antibiotics to diffuse.
2. Inoculation.
 - 2.1. Prepare a bacterial cells suspension with a density of 0.5 on McFarland scale in compliance with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAS) guidelines for the disk diffusion method.
 - 2.2. Apply the suspension to the solidified agar using a cotton swab, forming a bacterial lawn.
3. Incubation.
 - 3.1. Incubate for 16–24 hours at 37°C.
 - 3.2. After the appropriate incubation time, inhibition zones will form, consistent with the resulting diffusion gradient.
 - 3.3. A triangular interaction imaging surface will be created inside the insert with active antibiotics. In each corner of this area, two adjacent antibiotics interact.
4. Quantitative measurements of drug interactions.
 - 4.1. Perform plate imaging to measure antibiotic interaction, e.g. with a gel-doc camera or a hand-held mobile device.
 - 4.2. Perform the analysis with an appropriately calibrated algorithm that uses previously developed diffusion models.
 - 4.2.1. Indicate which antibiotic has been placed in each tank of the test.
 - 4.2.2. The algorithm developed by the method developers recalls stored diffusion maps corresponding to the antibiotics used in the assay and combines them into a test-specific model. It is then matched to the imaging performed on the test.
 - 4.2.3. The algorithm determines IC (inhibitory concentration) and CP (combination inhibitory point) for all three antibiotics, individually and in combination. The extent of antibiotic interaction is determined quantitatively based on points at the edge of the inhibition zone, according to the FICI formula.

5. Calculation of FICI value.

$$FICI_{AB} = C_A / IC_A + C_B / IC_B$$

Where:

C_A , C_B – concentrations of antibiotic A and B, respectively,

IC_A , IC_B – inhibitory concentrations of antibiotic A and B, respectively.

6. Strips impregnated with antibiotic gradient used in methodology for determining antimicrobials synergistic effect

The synergistic effects of antimicrobial agents *in vitro* can also be evaluated using methods available in most microbiological laboratories, i.e., strips impregnated with antibiotic in the concentration gradient. The following methods have been developed so far:

- E-test fixed ratio method,
- cross method,
- MIC:MIC ratio evaluation,
- E-test agar method (Laishram *et al.* 2017; Guzek 2023)

Before performing the methods mentioned above, the MIC values for all antibiotics tested should be determined.

Methods based on antibiotic-impregnated strips with the concentration gradient have an advantage over other methods due to their simplicity and easy access to this procedure for all laboratories. However, synergism can be tested only between two antibiotics in this way. Furthermore, the limitation of these techniques is the lack of their use against resistant isolates whose MIC values exceed the maximum antimicrobial concentration placed on a strip scale since the exact MIC value must be known *a priori* to assess the synergy.

E-test fixed ratio method – procedure

1. Prepare suspensions of the tested bacteria (density 0.5 McFarland) and inoculate on Mueller-Hinton Agar medium (MHA).
2. Apply a strip containing antibiotic A on the MHA.
 - 2.1. The area where the strip containing antibiotic A is located should be precisely marked.
3. Incubate a plate at room temperature for one hour to let the antibiotic diffuse from the strip into the MHA medium.
4. Remove the antibiotic A strip.
 - 4.1. Clean the strip with alcohol and leave it as a template for reading the MIC value.
 - 4.2. Apply the strip containing antibiotic B to the same spot.
5. Incubate the culture on the plate for 16–18 hours at 35°C ± 2°C (as recommended by the strip manufacturer).
6. Reading and interpretation of results: read the MIC values for the strips used and calculate the FICI value after the incubation (Fig. 4. Assessment of the synergistic effect of antibiotics by the method of constant coefficients.) (Laishram *et al.* 2017; Sreenivasan *et al.* 2022; Guzek 2023), which should be interpreted according to a standardized criteria.

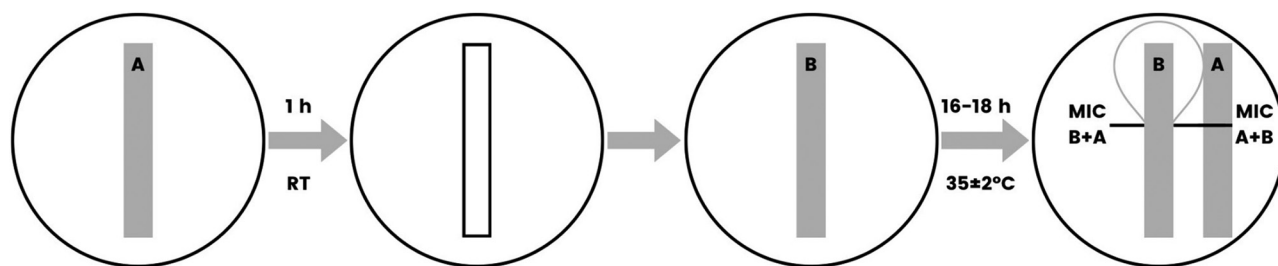


Fig. 4. Assessment of the synergistic effect of antibiotics by the method of constant coefficients.

Cross method – procedure

1. Inoculate the MHA plate with the tested bacterial suspension (density 0.5 McFarland).
2. Place two strips containing antibiotics A and B.
 - 2.1. Arrange the strips to intersect at an angle of 90° at the concentration marked as the previously determined MIC values.
3. Culture on a plate incubation for 16–20 hours at $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (as recommended by the strip manufacturer).
4. Reading and interpretation of results: read the MIC values for the strips used and calculate the FICI value after the incubation (Fig. 5. Assessment of the synergistic effect of antibiotics by cross-method.), which should be interpreted according to standardized criteria.

Due to its high availability and ease of performing, the cross method is eagerly chosen to evaluate the com-

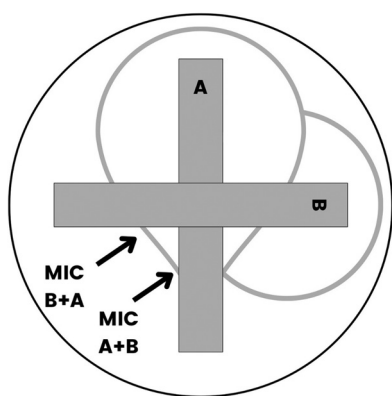


Fig. 5. Assessment of the synergistic effect of antibiotics by cross-method.

bination of two antibiotics. However, the results of this procedure can differ significantly from those obtained in the “time-kill” test, which is considered the gold standard for this purpose (Nasomsong *et al.* 2022).

MIC:MIC ratio evaluation – procedure

1. Apply two strips with a concentration gradient of antibiotics A and B onto the MHA medium with a bacterial suspension plated initially.
 - 1.1. Mark previously obtained MIC value for each drug separately with a marker on the bottom of the plate.
2. Incubate the plate for one hour at room temperature to allow the antibiotics to diffuse from the strips.
3. Evaluation of antimicrobials synergism.
 - 3.1. Remove the first antibiotic strip from the culture after one hour.
 - 3.2. Place a new strip containing antibiotic A on the spot where the antibiotic B strip was located so that the MIC value from strip A corresponds to the MIC value for antibiotic B marked previously with the marker.
 - 3.3. Follow the same procedure for the second strip.
4. Culture on a plate incubation for 16–20 hours at $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (as recommended by the strip manufacturer).
5. Reading and interpretation of results: read the MIC values for the strips used and calculate the FICI value, which should be interpreted according to standardized criteria (Laishram *et al.* 2017; Guzek 2023). (Fig. 6. Evaluation of the synergistic effect of antibiotics by the MIC:MIC ratio evaluation.)

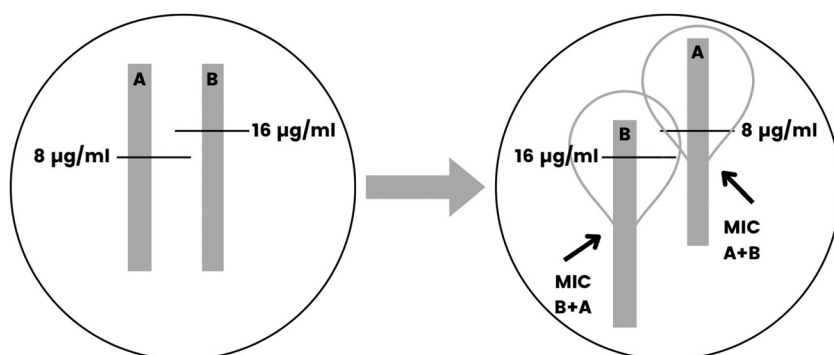


Fig. 6. Evaluation of the synergistic effect of antibiotics by the MIC:MIC ratio evaluation.

According to some previous results, in comparison with gradient diffusion methods used to assess the synergy of tobramycin and ceftazidime in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, the results obtained by Okoliegbe *et al.* suggest that the MIC:MIC ratio method should be considered as the preferred method for antibiotic interaction studies in diagnostic practice (Okoliegbe *et al.* 2021).

E-test agar method – procedure

1. Prepare the medium containing antibiotic A at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$ or $0.25 \times \text{MIC}$ of the given antimicrobial agent.
2. Place a strip with an antibiotic B on the medium plate.
3. Assess the MIC value of antibiotic B on the medium with antibiotic A.
4. Compare the obtained MIC value with the MIC value in the drug-free medium.
5. Interpretation of the results: Synergy is observed when there is more than a three-fold reduction in the MIC value on the medium containing the tested antibiotic (Laishram *et al.* 2017).

Marie *et al.* used this method to evaluate the combination of sulbactam and tazobactam with meropenem or colistin against the multidrug-resistant *A. baumannii* strain. However, the results obtained by this method did not coincide with the checkerboard assay, which demonstrated higher sensitivity in terms of synergism but identical in terms of addition (Marie *et al.* 2015).

7. Alternative methods for the determination of synergistic and additive antibiotic activity

Three of the many methods for determining antibiotic synergistic and additive activity not described in this article are worth mentioning. All of them are achievable in any basic medical diagnostic laboratory – double disc synergy test (a modification of the procedure typically used to assess the presence of drug resistance mechanisms in microorganisms), paper strip diffusion (which uses strips soaked in various antimicrobial solutions at concentrations equal to or higher than their MIC values) and the overlay inoculum susceptibility disc method.

Double-disc synergy test – procedure

1. Apply discs soaked with the antibiotics tested to the medium with the bacterial suspension. Apply a distance of 20 mm or corresponding to the sum of the radii of the inhibition zones of each antibiotic separately.

2. Incubate the plate for 24 hours at 35°C.
3. Interpret the results by assessing the diameter of the growth inhibition zones around the discs.
 - 3.1. Antibiotic synergism is demonstrated by an increase ≥ 2 mm in the growth zone diameter compared to the size of the diameter of the single agent, the combination of the growth inhibition zone between the drug A and B, or the growth inhibition zone appearing between the diffusing agents.
 - 3.2. An increase of the inhibition zone by < 2 mm is classified as slight synergism.
 - 3.4. Antagonism is detected when the zone of inhibition flattens at the diffusion interface of two antimicrobials (Laishram *et al.* 2017).

This method is not commonly used due to the relatively subjective and only qualitative assessment of the synergistic effect of antibiotics.

Paper strip diffusion – procedure

1. Place the strips perpendicular to each other on an MHA medium with a previously applied inoculum of the tested microorganisms.
2. Leave the filter paper strips with the antibiotics for several hours to allow antibiotics to diffuse into the medium.
3. Incubate the plate for 18–24 hours at 37°C (Laishram *et al.* 2017).

Apply antibiotic-soaked strips to a new MHA medium for 24 hours to allow antibiotics to diffuse into the medium, and then apply the microorganism using a membrane transfer technique as a possible alternative.

Interpretation of the results

- 4.1. A neutral/additive effect is considered when two oval areas of growth inhibition zones, connected at a 90-degree angle, appear.
- 4.2. Synergism is identified as enlargement or the presence of an inhibition zone around a 90-degree angle.
- 4.3. Antagonism is noted at incision or narrowing around an angle between strips.

This method is cost- and labour-intensive, and the results obtained by this technique are only qualitative.

Overlay inoculum susceptibility disc method – procedure

1. Prepare an agar medium containing antibiotic A at a concentration equal to half the MIC value for this antibiotic (so-called base agar layer).
2. Apply an agar layer without antibiotic (so-called inoculum layer) containing 10^6 CFU/ml of the tested strain.
3. Place discs containing different concentrations of antibiotic B on the surface after solidification of the previous agar layers.

4. Incubate for 24 hours at 37°C.
5. Interpretation of the results
 - 5.1. Synergism occurs when the diameter of the inhibition zone around the disc with antibiotic B increases by at least 19%.
 - 5.2. An additive effect is assessed with an increase in the inhibition zone diameter around the disc with antibiotic B of less than 19%.
 - 5.3. No visible change in the inhibition zone indicates an indifferent effect of the combinations of antimicrobials used.

8. Conclusions

Due to the dynamic increase in antibiotic resistance of microorganisms, mainly bacteria, and the long time required to develop and approve a new antibiotic for clinical practice, it is necessary to introduce the evaluation of the effectiveness of the already-known antibiotic combinations into routine diagnostic practice. There are many methods for testing synergistic and additive antibiotic activity, which vary in the availability of the necessary reagents and equipment, the difficulty and time of performance, as well as the reliability of the results obtained and the unambiguity of their interpretation (Papoutsaki *et al.* 2020; Okoliegbe *et al.* 2021). Depending on the study, the level of compliance with individual methods varies significantly. Differences may be related to the strain of bacteria tested, antibiotics used, or even the presence of particular resistance mechanisms. In their study of methods for detecting synergism in multidrug-resistant Gram-negative rods, Gaudereto *et al.* obtained compliance with the MIC: MIC method and “time-kill” ratio method at the level of 35–71% (Gaudereto *et al.* 2020). Therefore, a clear comparison of individual methods in a universal way for antibiotics and bacterial strains is currently beyond the capabilities of researchers due to divergent results depending on the strains, antibiotics and their combinations (Doern 2014).

The “gold standard” test remains the “time-kill” method, which provides information on bactericidal and bacteriostatic action at different time points and is a reliable reference method in comparing different procedures. However, the “time-kill” test is a time-consuming and relatively difficult method, so using strips with antimicrobials concentration gradients seems to be an attractive alternative. It is necessary to validate the results to ensure they are as reliable as possible.

In addition to routine testing of synergistic and additive activity of antibiotics, it is also necessary to develop new methods to implement in diagnostic and clinical practice. The CombiANT method seems to be a promising procedure, which may become

a method of great diagnostic importance soon, considering its ability to quickly test a combination of three drugs, easy interpretation of the results and accuracy comparable to the microdilution method (Fatsis-Kavalopoulos *et al.* 2020).

The checkerboard assay, the most popular method for synergism testing, as a modification of the MIC determination by antimicrobials broth microdilutions method, is an intuitive and easily accessible procedure due to the broad access to the required equipment and reagents. However, in contrast to the “time-kill” method, it only provides information on the bacteriostatic effect, which is the most significant limitation that may affect further clinical management.

The most accessible, easiest and cheapest methods are those using antibiotic concentration gradient strips or discs. Although validating the methodology based on their use and introducing uniform criteria for interpretation of the results obtained is difficult, in some situations, they may be the only possible procedure. Therefore, further studies are needed to introduce them into routine diagnostic and clinical practice while obtaining results comparable to other methods. It is essential to differentiate the reliability of the results of individual procedures with gradient strips, among which the MIC:MIC ratio method seems to be the most reliable one (Okoliegbe *et al.* 2021).

ORCID

Paweł Z. Kmieciowski <https://orcid.org/0009-0004-1315-7194>

Aniela Gabriel <https://orcid.org/0009-0006-6193-5610>

Dagmara Depka <https://orcid.org/0000-0003-2387-9778>

Tomasz Bogiel <https://orcid.org/0000-0001-6787-1378>

Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal connections with other persons or organizations, which might negatively affect the contents of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

References

1. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G.: New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, **8**, 101543 (2021)
2. Brennan-Krohn T., Kirby J.E.: When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. *Clin. Lab. Med.* **39**, 345–358 (2019a)
3. Brennan-Krohn T., Kirby J.E.: Antimicrobial Synergy Testing by the Inkjet Printer-assisted Automated Checkerboard Array and the Manual Time-kill Method. *J. Vis. Exp.* **146**, 10.3791/58636 (2019b)
4. Brennan-Krohn T., Truelson K.A., Smith K.P., Kirby J.E.: Screening for synergistic activity of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae using inkjet printer-based technology. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2775–2781 (2017)
5. Doern C.D.: When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 4124–8 (2014)

- 6 https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Break_point_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. 19.05.2024
- 7 <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases, 13.04.2024
- 8 Fatsis-Kavalopoulos N., Roemhild R., Tang P.-C., Kreuger J., Andersson D.I.: ComBIANT: Antibiotic interaction testing made easy, *PLOS Biol.* **18**, e3000856 (2020)
- 9 Gaudereto J.J., Neto L.V.P., Leite G.C., Espinoza E.P.S., Martins R.C.R., Prado G.V.B., Rossi F., Guimarães T., Levin A.S., Costa S.F.: Comparison of methods for the detection of in vitro synergy in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiol.* **20**, 97 (2020)
- 10 Garbusińska A., Szliszka E.: Aktywność leków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w kombinacjach wobec pałeczek Gram-ujemnych w badaniach *in vitro*. *Post. N. Med.*, **XXX(08)**, 427–433 (2017)
- 11 Guzek A.: Metodologia oznaczania synergizmu między antybiotykami z zastosowaniem pasków z gradientem stężeń antybiotyków w warunkach *in vitro*. *Forum Zakażeń*, **14**, 19–24 (2023)
- 12 Karakostas S., Ioannou P., Kofleridis D.D.: In search for a synergistic combination against pandrug-resistant *A. baumannii*; methodological considerations. *Infection*, **50**, 569–581 (2022)
- 13 Laishram S., Pragasam A.K., Bakthavatchalam Y.D., Veerarahavan B.: An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J. Med. Microbiol.* **35**, 445–468 (2017)
- 14 Marie M.A.M., Krishnappa L.G., Alzahrani A.J., Mubarak M.A., Alyousef A.A.: A prospective evaluation of synergistic effect of sulbactam and tazobactam combination with meropenem or colistin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **15**, 24–29 (2015)
- 15 Nasomsong W., Nulsopapon P., Changpradub D., Pungcharoenkijkul S., Hanyanunt P., Chatreewattanukul T., Santimaleeworagun W.: Optimizing Doses of Ceftolozane/Tazobactam as Monotherapy or in Combination with Amikacin to Treat Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, **11**, 517 (2022)
- 16 Okoliegbe I.N., Hijazi K., Cooper K., Ironside C., Gould I.M.: Antimicrobial Synergy Testing: Comparing the Tobramycin and Ceftazidime Gradient Diffusion Methodology Used in Assessing Synergy in Cystic Fibrosis-Derived Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, **10**, 967 (2021)
- 17 Papoutsaki V., Galani I., Papadimitriou E., Karantani I., Karaiskos I., Giamarellou H.: Evaluation of in vitro methods for testing tigecycline combinations against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Global Antimicrob. Resist.* **20**, 98–104 (2020)
- 18 <https://pharmaceutical-journal.com/article/news/only-12-new-antibiotics-entered-the-market-in-five-years-who-warns-in-review>
Sayburn A.: Only 12 new antibiotics entered the market in five years, WHO warns in review. *The Pharmaceutical Journal*, **310** (2023), 04.12.2024
- 19 Sreenivasan P., Sharma B., Kaur S., Rana S., Biswal M., Ray P., Angrup A.: In-vitro susceptibility testing methods for the combination of ceftazidime-avibactam with aztreonam in metallo-beta-lactamase producing organisms: Role of combination drugs in antibiotic resistance era. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **75**, 454–462 (2022)
- 20 Tang P.-C., Sánchez-Hevia D.L., Westhoff S., Fatsis-Kavalopoulos N., Andersson D.I.: Within-species variability of antibiotic interactions in Gram-negative bacteria. *mBio*, **15**, e0019624 (2024)
- 21 <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354545/9789240047655-eng.pdf?sequence=1>.
WHO. World Health Organization: 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis, 13.04.2024
- 22 https://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/Biuletyn/Biuletyn-Informacyjny-2_2022.pdf
Żabicka D., Grzegorzczak M.: Oporność na antybiotyki w Polsce i Europie w 2021 roku – dane sieci EARS-Net. *Oporność na antybiotyki. Biuletyn informacyjny*, **2** (2022), 19.05.2024

METODOLOGIA BADANIA DZIAŁANIA SYNERGISTYCZNEGO I ADDYCYJNEGO *IN VITRO* LEKÓW PRZECIWBAKTERYJNYCH

Paweł Z. Kmieciowski^{1,*}, Aniela Gabriel¹, Dagmara Depka², Tomasz Bogiel²

¹ Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologii przy Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: W związku z dynamicznym wzrostem antybiotykooporności obserwowanym na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, wskazane jest poszukiwanie nowych metod terapeutycznych w leczeniu zagrażających życiu infekcji. Efektywne leczenie zakażeń wielolekoopornymi drobnoustrojami coraz częściej wymaga korzystania z leków ostatniej szansy, a nowe antybiotyki generują oporność w krótszym czasie, niż zajmuje ich wprowadzenie do lecznictwa. Wskazane zatem jest poszukiwanie rozwiązań z wykorzystaniem aktualnie dostępnych antybiotyków. Skuteczną terapię zakażeń wielolekoopornymi drobnoustrojami umożliwiać może wykorzystanie oddziaływań addycyjnych oraz synergistycznych, wynikających z łączenia różnych grup antybiotyków, włączając te o odmiennych mechanizmach działania – również takich, na które z osobna dany szczep bakterii jest oporny. W niniejszej pracy zostały opisane dostępne metody oznaczania działania synergistycznego oraz addycyjnego antybiotyków w warunkach *in vitro* oraz metoda CombiANT, będąca aktualnie w fazie testów. Celem pracy jest przedstawienie możliwych metod, pozwalających na oznaczenie addycyjnego i synergistycznego działania między antybiotykami *in vitro* oraz zaproponowanie odpowiednich procedur laboratoryjnych do ich stosowania. W niniejszej pracy dokonano przeglądu najnowszego piśmiennictwa naukowego dotyczącego dostępnych metod oznaczania oddziaływania antybiotyków względem siebie. Badania kliniczne wskazują na znaczne korzyści wykorzystywania zjawiska addycji oraz synergii antybiotyków w praktyce klinicznej, nie tylko poprawiając skuteczność terapii, ale również minimalizując działanie niepożądane oraz zmniejszeniu ryzyka rozwoju antybiotykooporności *de novo*. Pomimo znaczącego problemu, jakim jest rosnący poziom antybiotykooporności, w praktyce klinicznej w dalszym ciągu brakuje jednoznacznej standaryzacji metod oznaczania synergizmu. Konieczne są dalsze badania, w celu określenia najkorzystniejszego standardu, dostępnego dla szerokiego zakresu zakładów diagnostyki mikrobiologicznej.

1. Wprowadzenie. 2. Metodyka wyszukiwania i doboru piśmiennictwa. 3. Metoda szeregów mikrorozcieńczeń dwóch antybiotyków w bulionie. 4. Test „time-kill”. 5. Test CombiANT. 6. Paski z gradientami stężeń antybiotyków stosowane w metodach oznaczeń ich synergistycznego działania. 7. Inne metody oznaczania synergizmu i addycji antybiotyków. 8. Wnioski.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, synergizm antybiotykowy, test szachownicy, test „time-kill”

1. Wprowadzenie

W czasie transformacji epidemiologicznej, do której doszło na początku XX wieku, dokonano się przesunięcie głównej przyczyny zgonów na świecie z chorób infekcyjnych na te nieinfekcyjne. Pojawiła się nadzieja na ostateczne zwycięstwo medycyny nad chorobami powodowanymi przez drobnoustroje, czemu sprzyjało odkrycie w latach 40. i 50. ubiegłego stulecia wielu antybiotyków. Niestety po upływie zaledwie kilku dekad, ze względu na dynamiczny wzrost antybiotykooporności, choroby zakaźne ponownie stały się jednym z największych zagrożeń zdrowia publicznego. Naukowcy,

w tym tacy jak Venkatasubramanian Ramasubramanian, prezes Klinicznego Towarzystwa Chorób Zakaźnych w Indiach, już od jakiegoś czasu przywołują ostrzeżenia o nowej erze postantybiotkowej (Sayburn 2023).

W sytuacji znaczącego tempa narastania antybiotykooporności na świecie, sytuacja epidemiologiczna w Polsce wydaje się szczególnie trudna, również na tle Europy. Dla przykładu w 2021 roku izolaty *Escherichia coli* odporne na fluorochinolony stanowiły w Polsce 33,1% izolowanych szczepów *E. coli* (populacyjnie ważona średnia europejska: 21,9%), izolaty *Klebsiella pneumoniae* odporne na karbapenemy – 19,5% (populacyjnie ważona średnia europejska: 11,7%), a izolaty

* Autor korespondencyjny: Paweł Z. Kmieciowski, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologii przy Katedrze Mikrobiologii, Tomasz Bogiel Katedra Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz e-mail: kmieciowski.pawel@gmail.com, t.bogiel@cm.umk.pl

© 2024 Paweł Z. Kmieciowski et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Metodologia badania działania synergistycznego i addycyjnego *in vitro* leków przeciwbakteryjnych. Kmieciowski P.Z. i wsp., ADV MICROBIOL-NY, 2024, 63, 4, 199–222

Enterococcus faecium oporne na wankomycynę – 34,3% (populacyjnie ważona średnia europejska: 17,2%). Ponad połowa izolowanych szczepów *K. pneumoniae* wykazywała wielolekooporność (MDR, ang. multi-drug resistance), co oznaczało, w tym przypadku, oporność jednocześnie na aminoglikozydy, fluorochinolony i cefalosporyny III generacji (Żabicka i Grzegorzczak 2022). Niepokojąca jest duża różnica między stopniem antybiotykooporności w Polsce a w krajach Europy zachodniej i północnej. W 2022 roku szczepy *Acinetobacter baumannii* oporne na karbapenemy stanowiły w Polsce 76,4% izolatów, podczas gdy w Niemczech i we Francji zaledwie 3,5%, a w Szwecji – 2,7% European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Skuteczne leczenie zakażeń utrudnia ponadto stagnacja na rynku farmaceutycznym. Od 2017 do 2022 roku zatwierdzono zaledwie 12 nowych antybiotyków, w tym tylko dwa – waborbaktam i lefamulina – należą do nowych grup leków. Dużym ograniczeniem i wyzwaniem są koszty wprowadzania nowych terapeutyków na rynek oraz konieczność zastrzeżenia niektórych najnowszych środków jako leków ostatniej szansy. Oporność na te nowe leki zgłaszana jest jednak już w ciągu 2–3 lat od ich wprowadzenia do stosowania (World Health Organization 2021).

Choć trwają badania nad nowymi preparatami i strategiami przeciwbakteryjnymi, takimi jak przeciwciała monoklonalne czy bakteriofagi (World Health Organization 2021), w świetle tak dynamicznego rozwoju antybiotykooporności konieczne jest poszukiwanie nowych sposobów leczenia zakażeń z wykorzystaniem dostępnych już antybiotyków. Bardzo obiecującą metodą jest łączenie w terapii antybiotyków o różnych mechanizmach działania – również takich, na które z osobna dany szczep bakterii jest odporny. Ich addycyjne lub synergistyczne działanie może pozwolić na zmniejszenie wartości ich minimalnego stężenia hamującego (MIC, ang. minimal inhibitory concentration), a nawet przełamać barierę oporności szczepu na leki. Dodatkowymi zaletami uzyskania synergizmu skojarzonych antybiotyków są: maksymalizacja efektów leczenia przy zmniejszonym ryzyku rozwoju antybiotykooporności *de novo* oraz możliwość korzystania z mniejszych dawek leków (Garbusińska i Szliszka 2017). Warto przypomnieć, że łączenie antybiotyków w terapii jest praktyką niemal tak starą jak sama antybiotykoterapia. Jest to widoczne w historii leczenia zakażeń wywołanych przez prątki gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), w której szybko po odkryciu streptomycyny rozpoczęto kojarzenie jej z innymi lekami. Stwierdzono bowiem, że w ciągu kilkumiesięcznej farmakoterapii gruźlicy prawdopodobieństwo rozwoju oporności na streptomycynę stosowaną w monoterapii może wynosić nawet 100% (Brennan-Krohn i Kirby 2019a).

Obecnie stosuje się kilka metod badania działania addycyjnego i synergistycznego antybiotyków. Są to metody wykorzystujące paski nasyczone gradientem stężeń antybiotyków, preparaty przeciwdrobnoustrojowe w krążkach, substancje przeciwbakteryjne rozcieńczane w agarze, metodę szachownicy, tzw. test „time-kill”, dynamiczne modele farmakokinetyczne i farmakodynamiczne (PK/PD) *in vitro*, półmechaniczne modele PK/PD, a nawet modele zwierzęce *in vivo* (Karakonstantis i wsp. 2022). W artykule scharakteryzowano i opisano krok po kroku metodologię kilku wspomnianych metod, które w ocenie autorów mają największy potencjał na wykorzystywanie w codziennej praktyce laboratoryjnej i klinicznej jako rutynowe metody badania połączeń antybiotyków, co w przyszłości może przyczynić się do poprawy stanu klinicznego wielu pacjentów cierpiących z powodu zakażeń wywołanych wieloantybiotykoopornymi szczepami bakterii.

2. Metodyka wyszukiwania i doboru piśmiennictwa

Do przeglądu piśmiennictwa wykorzystano bazy PubMed i Google Scholar, wyszukując frazy: antibiotic resistance, antibiotic synergism, antibiotic interaction methodology, antibiotic FICI assessing, checkerboard array, „time-kill” curves, synergism disk-based methods, synergism gradient-based methods, antibiotic gradient-based methods z ostatnich 10 lat. Spośród uzyskanych wyników wyselekcjonowano artykuły badania połączeń antybiotyków, z uwzględnieniem opisów najczęściej stosowanych metod badania synergizmu i addycji antybiotyków w ujęciu merytorycznym, klinicznym i/lub proceduralnym. Informacje na temat epidemiologii antybiotykooporności uzyskano z bazy Surveillance Atlas of Infectious Diseases Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób.

3. Metoda szeregów mikrorozcieńczeń dwóch antybiotyków w bulionie

Metoda mikrorozcieńczeniowa (tzw. test szachownicy) to najpopularniejsza metoda badania aktywności połączeń antybiotyków w warunkach *in vitro*, będąca modyfikacją standardowej metody oznaczania MIC w bulionie, techniki rutynowo wykorzystywanej np. przy określaniu wartości MIC kolistyny. Najczęściej wykorzystuje się 96-dółkową polistyrenową płytkę, którą dostosowuje się do badania aktywności dwóch antybiotyków. Tworzy się gradientową „szachownicę” rozcieńczeń dwóch antybiotyków, tak aby w poszczególnych dółkach oceniona została każda możliwa kombinacja stężeń badanych leków. Wiąże się to z dwoma

poważnymi ograniczeniami – jest to metoda statyczna, w której działanie antybiotyków oceniane jest w konkretnym punkcie czasowym, bez możliwości ich oceny na przestrzeni kilkunastu godzin inkubacji, oraz dostarcza informacji tylko o działaniu bakteriostatycznym, bez możliwości zbadania właściwości bójczych leków (w zastosowanej metodologii te dwa efekty są nie do odróżnienia) (Brennan-Krohn i Kirby 2019a). Istotne jest także rzeczywiste ograniczenie liczby badanych antybiotyków do dwóch. Przy większej ich liczbie metoda ta szybko staje się niepraktyczna, nawet przy założeniu, że co najmniej jeden z nich będzie badany w wąskim zakresie stężeń (Doern 2014; Brennan-Krohn i Kirby 2019a). Ponadto w metodzie tej potrzeba wielu odczynników oraz konieczne jest przygotowanie szeregu rozcieńczeń antybiotyków.

W opisywanej metodzie do dołków płytki polistyrenowej dodaje się wystandaryzowane inokula bakteryjne (o stałej gęstości i objętości) w bulionie Muellera-Hinton i antybiotyki w odpowiednich stężeniach (najczęściej dwa z dwóch różnych grup). Stężenia antybiotyków, które uzyskuje się w serii dwukrotnych rozcieńczeń, powinny odnieść się do stężeń możliwych do uzyskania w płynach ustrojowych pacjenta (Doern 2014; Garbusińska i Szliszka 2017; Brennan-Krohn i Kirby 2019a). Po okresie inkubacji ocenia się wzrost bakterii we wszystkich dołkach płytki. Dla stężeń w dołkach, w których wzrost został zahamowany, wylicza się wskaźnik FICI (ang. fractional inhibitory concentration index) i na jego podstawie klasyfikuje się interakcję antybiotyków jako działanie antagonistyczne ($FICI > 4$), obojętne ($1 < FICI \leq 4$), addytywne ($0,5 < FICI \leq 1$) lub synergistyczne ($FICI \leq 0,5$). Przytoczony sposób klasyfikacji jest najczęstszy, choć autorzy prac naukowych korzystają czasem z innych przedziałów dla FICI bądź nie wyróżniają addycji antybiotyków. Wskaźnik FICI dla danej kombinacji stężeń, przy których zaobserwowano zahamowanie wzrostu, jest sumą FIC (ang. fractional inhibitory concentration) obu leków, czyli stosunku stężenia leku w tym dołku do jego MIC. Zatem, skoro o synergizmie świadczy $FICI \leq 0,5$, a zakres błędu dla badania MIC w standardowym rozcieńczaniu w bulionie wynosi ± 1 dwukrotne rozcieńczenie (przy czym zakres błędu zwiększa się przy badaniu leków w skojarzeniu), to definicja synergizmu jest spełniona, jeśli każdy lek w dołku ma stężenie co najmniej o połowę niższą niż jego MIC oceniane indywidualnie w osobnym oznaczeniu (Garbusińska i Szliszka 2017; Brennan-Krohn i Kirby 2019a).

Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie jest nadal modyfikowana i udoskonalana, np. poprzez wykorzystanie bio-drukarki, umożliwiającej precyzyjne odmierzanie mikroobjętości i przyspieszającej oznaczenie (Brennan-Krohn i Kirby 2019b). Opisana poniżej procedura uwzględnia odczynniki i aparaturę powszechnie dostępne w laboratoriach mikrobiologicznych.

Procedura

1. Przygotowanie inokulum bakteryjnego.
 - 1.1. Skalibruj densytometr względem próbki kontrolnej o gęstości optycznej 0.5 w skali McFarlanda.
 - 1.2. Zbierz badany szczep sterylną eżą z podłoża agarowego i umieść go w odpowiednim dla metody roztworze (najczęściej w roztworze fizjologicznym soli).
 - 1.3. Wymieszaj przez worteksowanie.
 - 1.4. Zmierz gęstość optyczną zawiesiny w densytometrze.
 - 1.5. W razie potrzeby dodaj masy bakterii lub szczepu kontrolnego za pomocą eży w celu otrzymania zawiesiny o gęstości optycznej 0.5 w skali McFarlanda.
2. Oznaczenie MIC badanych antybiotyków (metoda do wyboru).
3. Przygotowanie roztworów antybiotyków.
 - 3.1. Wybierz antybiotyk, który będzie rozcieńczany w rzędach od 1. do 12., czyli rzędach poziomych (antybiotyk A), a który w dołkach $A \rightarrow H$, czyli kolumnach pionowych (antybiotyk B), uwzględniając zasadność zbadania jednego z nich w szerszym zakresie stężeń.
 - 3.2. Przygotuj około 400 μl roztworu antybiotyku A i około 350 μl – antybiotyku B o stężeniu czterokrotnie (A) i ośmiokrotnie (B) wyższym niż graniczna wartość oporności danego leku dla gatunku badanego szczepu (Brennan-Krohn *i wsp.* 2017; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2024). Wybierz rozpuszczalnik zgodnie z wytycznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) “Solvents and Diluents for Preparing Stock Solutions of Antimicrobial Agents”. Jeśli wytyczne nie zawierają informacji o badanym antybyotyku, użyj rozpuszczalnika, który daje większą stabilność leku (Bellio *i wsp.* 2021).
 - 3.2.1. Można skorzystać ze wzoru:

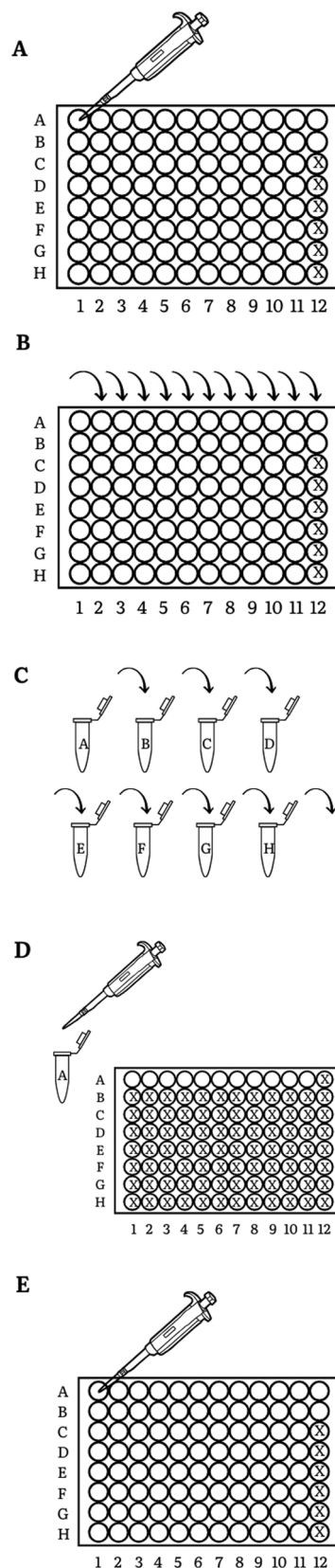
$$C_a - C_k = V_r$$

$$C_k - C_r = V_a$$
 gdzie C_a – stężenie wyjściowego roztworu antybiotyku [mg/l],
 C_k – stężenie końcowe roztworu antybiotyku [mg/l]
 C_r – stężenie rozpuszczalnika [mg/l]
 V_r – objętość rozpuszczalnika [μl]
 V_a – objętość wyjściowego roztworu antybiotyku [μl]

Dodanie V_a wyjściowego roztworu antybiotyku do V_r rozpuszczalnika pozwoli uzyskać roztwór antybiotyku o stężeniu C_k . C_k powinno mieć wartość czterokrotnie większą niż graniczna wartość oporności danego leku dla gatunku badanego szczepu.

4. Przygotowanie szachownicy stężeń. (Ryc. 1. Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie – przygotowanie szachownicy stężeń.)

- 4.1. Pipetą automatyczną dodaj do wszystkich dołków w rzędach od 1. do 11. oraz do dwóch w rzędzie 12. po 50 μ l MHB (bulion Muellera-Hinton). (Ryc. 1A. Dodanie bulionu Muellera-Hinton.)
- 4.2. Nanieś do wszystkich dołków (A-H) w rzędzie 1. po 50 μ l antybiotyku A.
- 4.3. Przenieś pipetą wielokanałową 50 μ l roztworu z dołków rzędu 1. do dołków z rzędu 2., z 2. do 3. i tak do rzędu 11. Każdorazowo wymieszaj uzyskany roztwór pipetą automatyczną (kilkukrotnie wolno naciągaj i wypuszczaj roztwór). Przenieś po 50 μ l roztworu z dołków 11A i 11B do 12A i 12B. Usuń z dołków 11C-H po 50 μ l roztworu. Dołek 12A będzie służyć jako kontrola wzrostu bakterii bez antybiotyków (kontrola dodatnia), a dołek 12B – kontrola jałowości odczynników i leków (kontrola ujemna). (Ryc. 1B. Przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń pierwszego antybiotyku.)
- 4.4. Przygotuj 8 probówek typu Eppendorf i oznacz je kolejno literami A-H.
- 4.5. Umieść za pomocą pipety automatycznej po 1 ml MHB we wszystkich probówkach Eppendorf.
- 4.6. Przenieś 333 μ l roztworu antybiotyku B (o stężeniu ośmiokrotnie większym niż graniczna wartość oporności danego leku dla gatunku badanego szczepu) do probówki A. Po umieszczeniu antybiotyku B w MHB w proporcji 1:3, otrzymany zostanie jego roztwór o stężeniu dwukrotnie wyższym niż graniczna wartość stężenia, które warunkuje oporność na dany lek.
- 4.7. Przenieś 333 μ l z probówki A do probówki B, wymieszaj pipetą automatyczną. Przenieś 333 μ l z probówki B do probówki C, wymieszaj i tak dalej kolejno aż do probówki H. Z probówki H usuń 333 μ l roztworu. (Ryc. 1C. Przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń drugiego antybiotyku.)
- 4.8. Do dołków w rzędzie A (A1-A11 – bez dołka A12, tj. kontroli dodatniej) rozpipetuj po 50 μ l roztworu z probówki A, z probówki B do wszystkich dołków w rzędzie B (B1-B12), z probówki C do dołków C1-C11 i tak dalej. (Ryc. 1D. Dodanie antybiotyków do siebie.)
- 4.9. Do każdego dołka z roztworami dodaj pipetą (można użyć pipety wielokanałowej) po 50 μ l MHB. Zachowaj ostrożność, aby przy korzystaniu z pipety wielokanałowej nie dodać MHB do dołków 12C-H. (Ryc. 1E. Ponowne dodanie bulionu Muellera-Hinton.)
- 4.10. Dodaj 50 μ l zawiesiny bakterii do wszystkich dołków z roztworami (oprócz 12B, tj. kontroli ujemnej).



Ryc. 1. Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie – przygotowanie szachownicy stężeń.

- A – dodanie bulionu Muellera-Hinton.
 B – przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń pierwszego antybiotyku.
 C – przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń drugiego antybiotyku.
 D – dodanie antybiotyków do siebie.
 E – ponowne dodanie bulionu Muellera-Hinton.

5. Inkubacja przez 16–24 godzin w temperaturze 37°C.
6. Ocena wzrostu.

- 6.1. Oceń zmętnienie w dołkach po zakończeniu inkubacji. Brak zmętnienia oznacza zahamowanie wzrostu bakterii przez antybiotyki.

- 6.2. Zapisz, w których połączeniach stężeń zaobserwowano zahamowanie wzrostu. Dla tych kombinacji oblicz wskaźnik FICI:

$$FICI = FIC_x + FIC_y$$

$$FIC_x = MIC_x / MIC_{xc}$$

$$FIC_y = MIC_y / MIC_{yc}$$

gdzie MIC_x , MIC_y – MIC leku X lub Y użytego samodzielnie,

MIC_{xc} , MIC_{yc} – stężenie leku X lub Y w skojarzeniu w danym dołku, dla którego wyznaczane jest FICI (Garbusińska i Szliszka 2017).

- 6.3. Oceń wartości FICI według kryteriów podanych powyżej i sklasyfikuj połączenia w różnych stężeniach jako synergistyczne, addytywne, obojętne bądź antagonistyczne.

- 6.4. Jeśli w rzędzie nastąpiło tzw. “pominięcie dołka” (np. w dołku C8 brak wzrostu, w C9 wzrost, w C10 brak wzrostu), wylicz FICI dla C10, aby uniknąć błędnej interpretacji, tj. np. wyniku fałszywie dodatniego (Brennan-Krohn i wsp. 2017).

4. Test “time-kill”

Test “time-kill” jest metodą, której wynik dostarcza informacji zarówno na temat synergistycznego działania antybiotyków, jak i dynamiki wzrostu bakterii oraz aktywności bakteriobójczej preparatu (Brennan-Krohn i Kirby 2019b). Test opiera się na analizie przeżywalności drobnoustrojów w badanych stężeniach dwóch antybiotyków w wybranych odstępach czasowych. Wzajemne oddziaływanie dwóch leków ustala się, porównując liczbę przeżywających bakterii jako CFU/ml (liczba jednostek tworzących kolonie na ml) w badanej kombinacji antybiotyków i ich liczbę w najlepiej działającym pojedynczym chemioterapeutyku. Uzyskane wyniki prezentowane są na krzywych zabicia “time-kill”. Synergizm stwierdza się, gdy różnica między dwoma próbami wynosi $\geq 2_{\log_{10}}$ (Brennan-Krohn i Kirby 2019b). W momencie, gdy różnica w liczbie CFU/ml między kombinacją dwóch antybiotyków w momencie rozpoczęcia inkubacji i po 24 h wynosi $\geq 3_{\log_{10}}$, uznaje się ją za bakteriobójczą. Test “time-kill” przedstawiany jest jako alternatywa dla metody szachownicy (Garbusińska i Szliszka 2017).

Zdecydowaną jego zaletą w przeciwieństwie do metody szachownicy, która jest w stanie określić jedynie działanie bakteriostatyczne, jest możliwość określenia działania bakteriostatycznego, jak i bakteriobójczego. Dodatkowo test “time-kill” umożliwia okreś-

lenie działania kombinacji antybiotyków w różnych punktach czasowych (Brennan-Krohn i Kirby 2019b). Wadą testu “time-kill” jest natomiast większa pracochłonność i czasochłonność wykonania w porównaniu do metody szachownicy. Ponadto wykonanie testu “time-kill” jest bardziej kosztochłonne.

Procedura

1. Przygotowanie roztworów antybiotyków.

- 1.1. Należy określić docelowe stężenie chemioterapeutyku w oparciu o jego rozpuszczalność oraz o pożądane stężenia końcowe. Wyboru rozpuszczalnika należy dokonać w oparciu o wytyczne CLSI.

2. Hodowla wstępna.

- 2.1. Z jednodniowej hodowli bakteryjnej przygotuj w 0,9% NaCl zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda. Skontroluj zmętnienie za pomocą densytometru.

- 2.2. Dodaj 100 μ l zawiesiny bakteryjnej do 5 ml CAMBH (ang. Mueller-Hinton Broth, cation adjusted). Przenieś kroplę rozcieńczonej zawiesiny przy pomocy sterylnej pętli inokulacyjnej na płytkę z agarem z krwią w celu potwierdzenia czystości inokulum. Inkubuj tę hodowlę w 35°C.

- 2.3. Inkubuj pozostałą część zawiesiny w temperaturze 35°C przez minimum 3 h, do czasu uzyskania wzrostu w fazie logarytmicznej.

3. Roztwory związków przeciwdrobnoustrojowych.

- 3.1. Dodaj po 10 ml CAMBH do 5 szklanych probówek hodowlanych a następnie:

Probówka nr 1: Dodaj pierwszy antybiotyk w ilości odpowiadającej jego docelowemu stężeniu.

Probówka nr 2: Dodaj drugi antybiotyk w ilości odpowiadającej jego docelowemu stężeniu antybiotyku.

Probówka nr 3: Dodaj tę samą ilość antybiotyku pierwszego i drugiego, co do probówek 1 i 2.

Probówka nr 4: Kontrola wzrostu – nie należy dodawać antybiotyku.

Probówka nr 5: Kontrola ujemna – nie należy dodawać ani antybiotyku, ani później drobnoustrojów.

4. Wykonanie serii rozcieńczeń. (Ryc. 2. Metoda „time-kill” – wykonanie serii rozcieńczeń.)

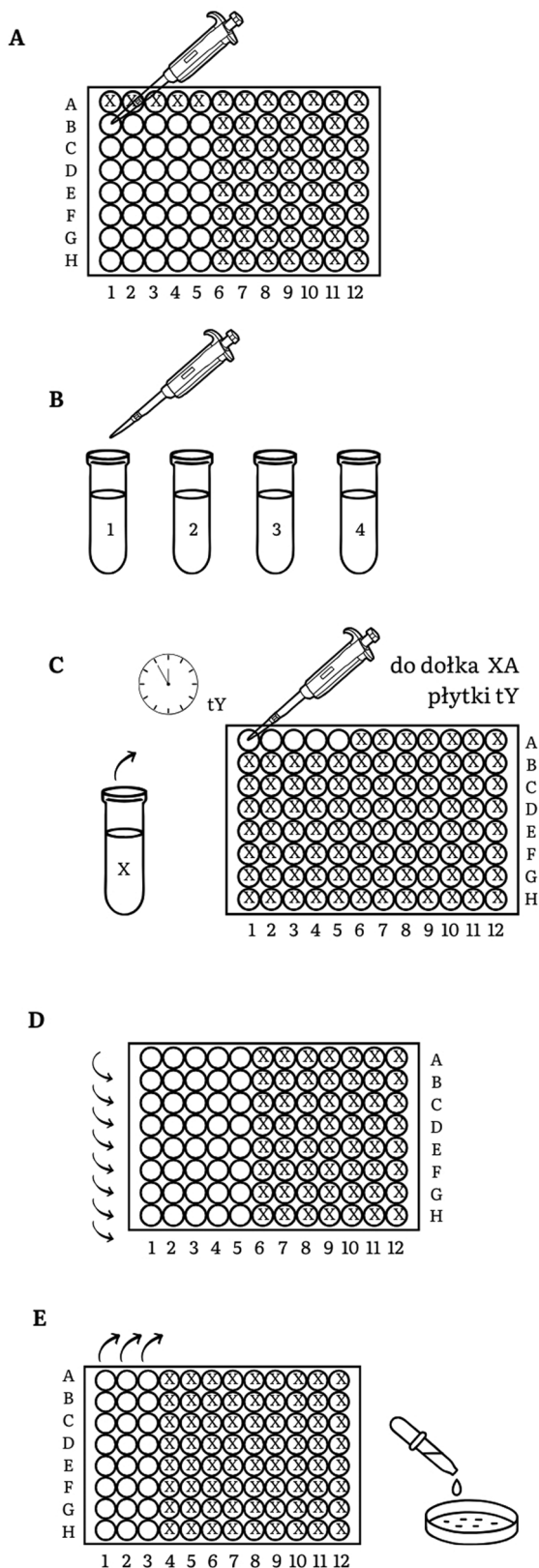
- 4.1. Przygotuj sześć 96-dołkowych płytek (oznaczonych: t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) ze studzienkami o pojemności 2 ml, które posłużą do serii rozcieńczeń. Umieść po 900 μ l 0,9% roztworu NaCl w rzędach B-H, kolumny 1–5. (Ryc. 2A. Przygotowanie sześciu 96-dołkowych płytek (t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) z 0,9% chlorkiem sodu.)

- 4.2. Przygotuj początkowe inokulum. W tym celu przenieś 1 ml zawiesiny do szklanej probówki w momencie, gdy hodowla osiągnie fazę logarytmicznego wzrostu. Rozcieńcz za pomocą

CAMBH lub zagęść w celu uzyskania gęstości 1,0 w skali McFarlanda.

- 4.3. Dodaj 100 μ l zawiesiny do probówek 1–4 i delikatnie wymieszaj. (Ryc. 2B. Dodanie zawiesiny bakteryjnej do probówek 1–4.)
- 4.4. Pobierz 150 μ l z każdej probówki w czasie t_0 (tuż po podaniu zawiesiny bakteryjnej) oraz po 1, 2, 4, 6 i 24 godzinach. Dodawaj kolejne porcje do kolejnych dołków w rzędach o numerach 1 odpowiednio oznaczonych (t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) płytek 96-dołkowych. (Ryc. 2C. Przeniesienie porcji zawiesiny do odpowiednich płytek w ustalonych wcześniej punktach czasowych.)
- 4.5. Pobierz za pomocą pipety wielokanałowej 100 μ l z rzędu A i przenieś do rzędu B. Wymieszaj zawartość dołków (kilkukrotnie wolno naciągaj i wypuszczaj roztwór). Uzyskane zostanie w ten sposób rozcieńczenie 1:10. Powtórz czynności dla rzędów B–H. Usuń 100 μ l z rzędu H. (Ryc. 2D. Uzyskanie rozcieńczenia 1:10.)
- 4.6. Pobierz za pomocą pipety wielokanałowej po 10 μ l z każdego dołka w kolumnach 1–3 wszystkich płytek i przenieś na odpowiednio oznakowane płytki z agarem Muellera-Hinton w celu zliczania kolonii przy użyciu metody „drop plate”. Odpowiednie oznakowanie powinno umożliwić identyfikację użytych antybiotyków, ich stężeń i czasu, po którym przeniesiono porcję zawiesiny bakteryjnej na płytkę (t_0 – t_{24}). Pozostaw krople do całkowitego wyschnięcia. (Ryc. 2E. Przeniesienie porcji zawiesin na płytki metodą „drop plate”.)
- 4.7. Po upływie doby umieść kroplę 10 μ l pobraną z kontroli negatywnej na wybraną płytkę, w celu potwierdzenia sterylności. Wszystkie płytki po odwróceniu powinny być inkubowane przez noc w warunkach zgodnych z zaleceniami.
5. Odczytanie wyników.
 - 5.1. Sprawdź kontrolę ujemną. Jeśli zaobserwowano jakikolwiek wzrost, wyniki oznaczenia nie powinny być wykorzystywane.
 - 5.2. Widoczne na płytkach kolonie powinny posiadać jednolitą morfologię, oczekiwaną dla danego szczepu.
 - 5.3. Znajdź krople z 3–30 koloniami dla każdej serii rozcieńczeń. Zlicz kolonie w tych kroplach i zapisz wraz ze współczynnikiem rozcieńczenia. Jeśli w serii rozcieńczeń nie ma kropli z 3–30 koloniami, policz kolejno – kolonie w ostatniej kropli z ponad 30 koloniami i w pierwszej kropli z koloniami.
 - 5.4. Oblicz dla każdej serii rozcieńczeń wartości CFU/ml w próbce na podstawie liczby kolonii w kropli, używając wzoru:

$$\text{CFU/ml} = 100 n / d$$



Ryc. 2. Metoda „time-kill” – wykonanie serii rozcieńczeń.

- A – przygotowanie sześciu 96-dołkowych płytek (t_0 , t_1 , t_2 , t_4 , t_6 , t_{24}) z 0,9% chlorkiem sodu.
- B – dodanie zawiesiny bakteryjnej do probówek 1–4.
- C – przeniesienie porcji zawiesiny do odpowiednich płytek ustalonych wcześniej punktach czasowych.
- D – uzyskanie rozcieńczenia 1:10.
- E – przeniesienie porcji zawiesin na płytki metodą „drop plate”.

gdzie:

n – liczba kolonii

d – współczynnik rozcieńczenia (1 dla nierozcieńczonej próbki – wiersz A, 0,1 dla pierwszego rozcieńczenia – wiersz B, 0,01 dla drugiego rozcieńczenia – wiersz C, itd.)

6. Analiza wyników.

- 6.1. Wykreśl krzywe wzrostu z trzech hodowli zawierających antybiotyki oraz kontrolę wzrostu. Oznacz czas na osi x , natomiast wartości CFU/ml na osi y .
- 6.2. Oblicz różnicę pomiędzy wzrostem w próbówce z dwoma antybiotykami po upływie 24 godzin a najbardziej aktywnym pojedynczym antybiotykiem w tym samym czasie (w CFU/ml). Kombinację antybiotyków należy uznać za synergistyczną, jeśli różnica wynosi $\geq 2_{\log_{10}}$. Oblicz różnicę w CFU/ml między kombinacją antybiotyków w próbówce w 24. godzinie i w czasie 0. Uznać kombinację za bakteriobójczą należy, jeśli różnica wynosi $\geq 3_{\log_{10}}$.

5. Test CombiANT

Kolejna metoda badania połączeń antybiotyków, CombiANT, nie jest jeszcze dostępna w praktyce badawczej ani diagnostyce mikrobiologicznej, a jej efekty w stosowaniu klinicznym nie są jeszcze znane. Po raz pierwszy została zaprezentowana w 2020 roku, ale dotychczasowe badania wskazują, że wyniki oznaczeń techniką CombiANT są identyczne jak w metodzie szachownicy (Fatsis-Kavalopoulos *i wsp.* 2020). Mimo braku dostępności aparatury i algorytmów interpretacji wyników zwalidowanych dla poszczególnych gatunków bakterii, z powodu wielu zalet tej metody i być może przełomowego ułatwienia badania połączeń antybiotyków zdecydowano o opisie tej procedury w niniejszej pracy.

CombiANT to test oparty na dyfuzji dostarczający informacji ilościowych o interakcjach trzech par antybiotyków. Wybrane antybiotyki umieszczane są w trzech zbiorniczkach, a wkładka z nimi lokowana w standardowej płytce z agarem. Wyróżnić można dwa pola. Na zewnątrz wkładki znajduje się pole, w którym każdy z antybiotyków działa indywidualnie. Wewnątrz płytki z antybiotykami znajduje się trójkątne pole, w którym dochodzi do interakcji pomiędzy poszczególnymi parami antybiotyków. Wyniki są generowane przez algorytm opracowany przez twórców, który został skalibrowany pod względem rodzaju i szybkości dyfuzji poszczególnych antybiotyków w wybranym podłożu. Zakres interakcji antybiotyków jest określany ilościowo na podstawie punktów na krawędzi strefy zahamowania, zgodnie ze wzorem FICI. Wartość FICI zostały zinterpretowane zgodnie z progami klinicznymi, gdzie $\leq 0,5$

wskazuje na synergję, $FICI > 0,5$, a ≤ 4 wskazuje na addycję, natomiast > 4 – na antagonizm (Tang *i wsp.* 2024).

Metodę CombiANT można zastosować bez wcześniejszego oznaczenia wrażliwości szczepu na dany antybiotyk. Jest to zdecydowana zaleta, ponieważ pozwala to na skrócenie czasu oczekiwania na wynik lekowrażliwości szczepu badanego. Test CombiANT ma taką samą dokładność, jak metoda mikrorozcieńczeń w bulionie, jednak jest bardziej wydajny i mniej złożony (Fatsis-Kavalopoulos *i wsp.* 2020). Dodatkowym atutem tej metody jest możliwość dokładnego oznaczenia stężenia hamującego, ponieważ stosuje się ciągły zakres stężeń antybiotyków, natomiast testy szachownicy tylko dwukrotne rozcieńczenia. Istotną wadą tej metody jest konieczność wykorzystania specjalnie zaprojektowanych i wykonanych wkładek, które nie mają zastosowania w innych badaniach laboratoryjnych.

Procedura

1. Przygotowanie wkładki z antybiotykami (Ryc. 3. Metoda CombiANT – wkładka i protokół eksperymentalny.) zawierającej trzy rezerwuary (zbiorniczki) oznaczone jako a, b, c oraz trójkątne pole oddziaływania – oznaczone jako d. (Ryc. 3A. Konstrukcja wkładki: zbiorniki antybiotyków (a, b, c) i obszar obrazowania interakcji (d).)
 - 1.1. Dodaj 0,5 ml płynnego agaru (w temperaturze 60°C) do każdego ze zbiorniczków wkładki zawierających antybiotyki (oznaczone odpowiednio jako a, b, c). Stężenie antybiotyku jest obliczane na podstawie wyniku kalibracji algorytmu analitycznego, co jest przygotowaniem do obrazowania cyfrowego (Ryc. 3B). Przygotowane wkładki mogą być bezpiecznie przechowywane w temperaturze 4–8°C przez okres 7 dni.
 - 1.2. Umieść wkładkę w płytce hodowlanej i dodaj drugą warstwę agaru, w ten sposób ją aktywując. Umożliwiona zostanie dyfuzja antybiotyków.
2. Posiew badanego drobnoustroju.
 - 2.1. Przygotuj zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, zgodnie z wytycznymi EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), tak jak dla oznaczeń metodą dyfuzyjno-krażkową.
 - 2.2. Nanieś zawiesinę na zestalony agar za pomocą bawełnianej wymazówki, tworząc murawę bakteryjną.
3. Inkubacja.
 - 3.1. Inkubuj przez 16–24 godzin w temperaturze 37°C.
 - 3.2. Po odpowiednim czasie inkubacji wytworzą się strefy zahamowania wzrostu bakterii zgodnie z powstałym gradientem stężeń.
 - 3.3. Wewnątrz wkładki z aktywnymi antybiotykami wytworzy się trójkątna powierzchnia obrazowania

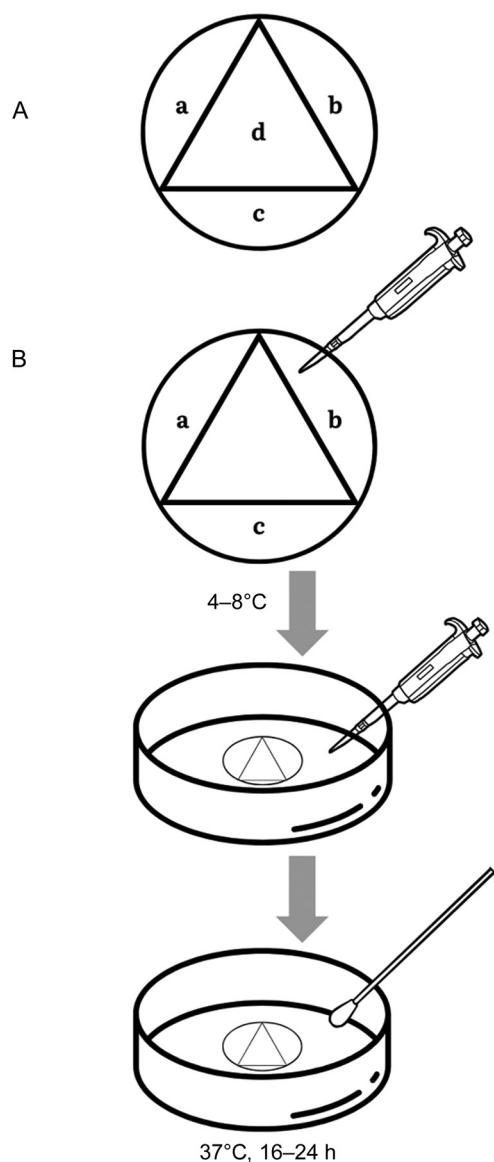


Fig. 3. Metoda CombiANT – wkładka i protokół eksperymentalny.

A – konstrukcja wkładki: zbiorniki antybiotyków (a, b, c) i obszar obrazowania interakcji (d).

B – protokół testu: Napełnienie wkładki poprzez dodanie do każdego ze zbiorników (a,b,c) 0,5 ml płynnego agar (60°C) zawierającego odpowiedni antybiotyk (A,B,C). Tak przygotowane wkładki można przechowywać w temperaturze 4°C – 8°C do 7 dni. Aby aktywować wkładkę, należy umieścić ją na szalce i dodać 25 ml agar, umożliwiając w ten sposób dyfuzję antybiotyków na powierzchnię agaru i obrzeża szalki. Po zestaleniu agaru nanieść zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 McFarlanda na powierzchnię agaru za pomocą wymazówki. Inkubacja płytek w 37°C przez 16–24 godzin pozwala na uwidocznienie stref zahamowania wzrostu (Fatsis-Kavalopoulos *et al.* 2020).

interakcji. W każdym rogu obszaru dochodzi do interakcji dwóch sąsiadujących ze sobą antybiotyków.

4. Ilościowe pomiary interakcji leków.

4.1. Wykonaj obrazowanie płytki w celu pomiaru interakcji antybiotyków, np. za pomocą kamery gel-doc lub ręcznego urządzenia mobilnego.

4.2. Dokonaj analizy za pomocą odpowiednio skalibrowanego algorytmu, który wykorzystuje uprzednio opracowane modele dyfuzji.

4.2.1. Określ, który antybiotyk został umieszczony w każdym zbiorniku testu.

4.2.2. Algorytm opracowany przez twórców metody przywołuje zapisane mapy dyfuzji odpowiadające antybiotynom użytym w teście i łączy je w model specyficzny dla testu. Jest on następnie dopasowywany do wykonanego obrazowania testu.

4.2.3. Algorytm wyznacza IC (ang. inhibitory concentration) oraz CP (ang. combination inhibitory point) dla trzech antybiotyków, zarówno indywidualnie, jak i w połączeniu. Zakres interakcji antybiotyków jest określany ilościowo na podstawie punktów na krawędzi strefy zahamowania, zgodnie ze wzorem FICI.

5. Obliczenie wartości FICI.

$$FICI_{AB} = C_A / IC_A + C_B / IC_B$$

gdzie:

C_A , C_B – stężenie antybiotyku A i B

IC_A , IC_B – stężenie hamujące antybiotyku A i B

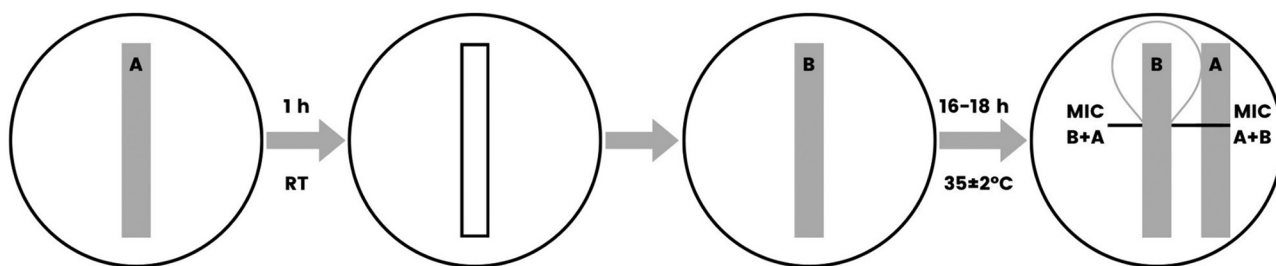
6. Paski z gradientami stężeń antybiotyków stosowane w metodach oznaczeń ich synergistycznego działania

Ocenę synergistycznego działania środków przeciwdrobnoustrojowych *in vitro* można przeprowadzić również, stosując metody dostępne w większości laboratoriów mikrobiologicznych, tj. wykorzystujące paski nasączone antybiotkiem w gradiencie stężeń. Dotychczas opracowano następujące metody:

- metoda stałych współczynników (ang. E-test fixed ratio method),
- metoda krzyżowa (metoda kąta 90°, ang. cross method),
- metoda proporcji – MIC:MIC,
- podłoża zawierających antybiotyk i pasków z gradientem stężeń (ang. E-test agar method) (Laishram *i wsp.* 2017; Guzek 2023).

Wykonanie badania każdą z wyżej wymienionych metod należy poprzedzić oznaczeniem wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) wszystkich badanych antybiotyków.

Metody oparte na wykorzystaniu pasków nasączonych antybiotkiem w gradiencie stężeń mają przewagę nad innymi metodami ze względu na prostotę wykonania oraz łatwy dostęp do tej procedury dla wszystkich laboratoriów. Jednak w ten sposób można badać synergizm tylko pomiędzy dwoma antybiotykami. Ograniczeniem technik wykorzystujących paski z zawartością



Ryc. 4. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą stałych współczynników.

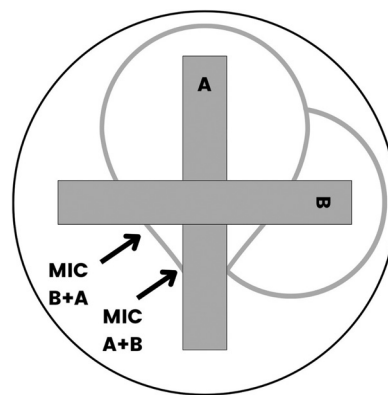
antybiotyku w gradiencie stężeń jest ponadto brak możliwości zastosowania ich wobec izolatów opornych, których wartości MIC wykraczają poza skalę paska, gdyż do oceny synergii należy znać dokładną wartość MIC.

Metoda stałych współczynników – procedura

1. Przygotuj badaną zawiesinę bakterii (gęstość 0,5 w skali McFarlanda) i nanieś ją na podłożu Mueller-Hinton Agar (MHA).
2. Nałóż na powierzchnię agaru pasek z gradientem stężeń badanego antybiotyku A. Dokładnie zaznacz pole, na którym znajduje się pasek zawierający antybiotyk A.
3. Inkubuj hodowlę na płytce w temperaturze pokojowej przez godzinę w celu dyfuzji antybiotyku z paska do podłoża.
4. Usuń pasek z antybiotykiem A.
 - 4.1. Oczyszcz pasek alkoholem i pozostaw jako wzór do odczytu wartości MIC.
 - 4.2. Nałóż na to samo miejsce pasek z gradientem stężeń antybiotyku B.
5. Inkubuj płytkę przez 16–18 godzin w $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (według zaleceń producenta pasków).
6. Odczyt i interpretacja wyników: po inkubacji odczytaj wartości MIC dla zastosowanych pasków i oblicz wartości współczynnika FICI, który należy interpretować według standardowo przyjętych kryteriów (Laishram *i wsp.* 2017; Sreenivasan *i wsp.* 2022; Guzek 2023). (Ryc. 4. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą stałych współczynników.)

Metoda krzyżowa – procedura

1. Badaną zawiesinę bakterii (gęstość 0,5 w skali McFarlanda) nanieś na płytkę z podłożem MHA.
2. Umieść dwa paski z gradientem stężeń badanych antybiotyków A i B w taki sposób, aby przecinały się pod kątem 90° na wysokości wcześniej oznaczonych wartości MIC.
3. Inkubuj płytkę przez 16–20 godzin w $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (według zaleceń producenta pasków).
4. Odczyt i interpretacja wyników:
Po inkubacji odczytaj wartości MIC obu zastosowanych antybiotyków i oblicz wartość współczynnika FICI, który należy interpretować według standar-



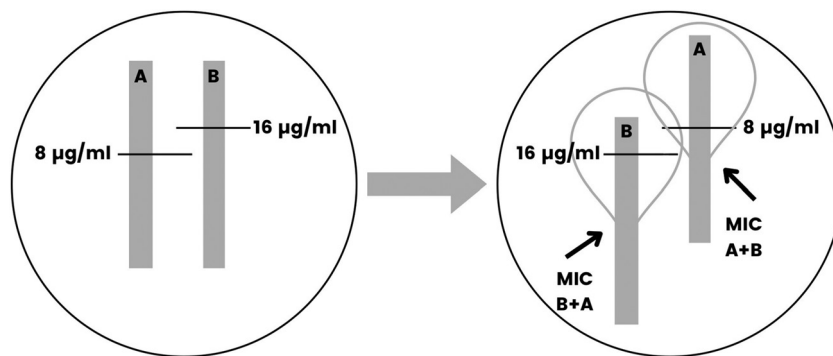
Ryc. 5. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą krzyżową.

dowo przyjętych kryteriów. (Ryc. 5. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą krzyżową.)

Ze względu na wysoką dostępność oraz łatwość wykonania, metoda krzyżowa jest chętnie wybierana do oceny skutków połączenia dwóch antybiotyków. Jednakże, wyniki tej procedury potrafią znacznie odbiegać od tych otrzymanych w testach “time-kill”, będących złotym standardem (Nasomsong *i wsp.* 2022).

Metoda proporcji MIC:MIC – procedura

1. Nałóż równolegle dwa paski z gradientem stężeń badanych antybiotyków A i B na płytkę MHA z naniesioną zawiesiną bakterii. Zaznacz na spodzie płytki markerem w odpowiednim miejscu zbadane wcześniej wartości MIC dla każdego z antybiotyków.
2. Inkubuj płytkę przez godzinę w temperaturze pokojowej celem dyfuzji antybiotyków.
3. Ocena synergizmu.
 - 3.1. Po upływie godziny usuń paski z antybiotykiem z płytki.
 - 3.2. Nałóż nowy pasek z gradientem stężeń antybiotyku B na miejsce, w którym znajdował się pasek z antybiotykiem A, w taki sposób, żeby wartość MIC z paska B korespondowała z oznaczoną markerem wartością MIC dla antybiotyku A.
 - 3.3. Postępuj analogicznie zastępując pasek B paskiem z antybiotykiem A.
4. Inkubuj płytkę przez 16–20 godzin w $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (według zaleceń producenta pasków).



Ryc. 6. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą proporcji MIC:MIC.

5. Odczyt i interpretacja wyników:

Dokonaj odczytu wartości MIC zastosowanych antybiotyków A i B. Oblicz wartość współczynnika FICI, który należy interpretować według standardowo przyjętych kryteriów (Laishram *i wsp.* 2017; Guzek 2023). (Ryc. 6. Ocena synergistycznego działania antybiotyków metodą proporcji MIC:MIC.)

W porównaniu metod dyfuzji gradientowej tobramycyny i ceftazydymu stosowanych w ocenie synergii w przypadkach zakażeń wielolekoopornymi *Pseudomonas aeruginosa*, wyniki uzyskane przez Okoliegbe *i wsp.* sugerują zasadność uznania metody MIC:MIC jako preferowanej w badaniach interakcji antybiotyków w praktyce diagnostycznej (Okoliegbe *i wsp.* 2021).

Metoda podłoża z zawartością antybiotyku i pasek z gradientem stężeń – procedura

1. Przygotuj podłoże zawierające jeden z badanych antybiotyków (A) w stężeniu $0,5 \times \text{MIC}$ lub $0,25 \times \text{MIC}$.
2. Umieść pasek z gradientem stężeń antybiotyku B na tym podłożu.
3. Odczytaj wartość MIC antybiotyku B na podłożu z antybiotykiem A.
4. Porównaj uzyskaną wartość MIC z wartością MIC w podłożu wolnym od leku.
5. Interpretacja wyniku:

Działanie synergistyczne stwierdza się, gdy występuje ponad trzykrotne zmniejszenie wartości MIC na podłożu zawierającym badany antybiotyk (Laishram *i wsp.* 2017).

Marie *i wsp.* używali tej metody w celu oceny połączenia sulbaktamu i tazobaktamu z meropenemem lub kolistyną wobec wielolekoopornego szczepu *Acinetobacter baumannii*. Wykazali, że w przypadku tych połączeń wyniki uzyskane metodą podłoża z zawartością antybiotyku i pasek z gradientem stężeń nie pokrywały się z wynikami uzyskanymi metodą szachownicy, która wykazała większą czułość w oznaczaniu synergizmu. W przypadku oddziaływania addycyjnego obie metody wykazały podobną czułość (Marie *i wsp.* 2015).

7. Inne metody oznaczania synergizmu i addycji antybiotyków

Spośród wielu nieopisanych w artykule metod oznaczania synergizmu i addycji antybiotyków na uwagę zasługują trzy, których wykonanie jest osiągalne w każdym podstawowo wyposażonym medycznym laboratorium diagnostycznym. Są to: metoda podwójnych krążków (modyfikacja procedury standardowo wykorzystywanej w celu oceny występowania mechanizmów oporności drobnoustrojów na leki), metoda nasączania bibuły filtracyjnej (wykorzystuje ona paski bibuły filtracyjnej nasączone różnymi roztworami przeciwdrobnoustrojowymi o stężeniu równym lub wyższym od ich wartości MIC) oraz metoda warstwowa.

Metoda dwóch krążków – procedura

1. Nałóż krążki nasączone badanymi antybiotykami na podłoże z naniesioną zawiesiną bakterii w odległości 20 mm lub odpowiadającej sumie promieni stref zahamowania wzrostu dla każdego antybiotyku oddzielnie.
2. Inkubuj płytki przez 24 godziny w temperaturze 35°C .
3. Zinterpretuj wyniki poprzez ocenę średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążków.
 - 3.1. Synergizm antybiotyków stwierdza się przy powiększeniu średnicy strefy zahamowania wzrostu o ≥ 2 mm w porównaniu ze średnicą pojedynczego środka, połączeniu strefy zahamowania wzrostu między lekiem A i B lub przy pojawieniu się strefy zahamowania wzrostu pomiędzy dyfundującymi lekami.
 - 3.2. Nieznaczące działanie synergistyczne wskazuje wzrost strefy zahamowania wzrostu o < 2 mm.
 - 3.3. Antagonizm stwierdza się przy spłaszczeniu strefy zahamowania wzrostu na styku dyfuzji dwóch środków przeciwdrobnoustrojowych (Laishram *i wsp.* 2017).

Metoda ta nie jest powszechnie stosowana ze względu na subiektywną i wyłącznie jakościową ocenę synergistycznego działania antybiotyków.

Metoda nasączania bibuły filtracyjnej – procedura

1. Na płytce MHA z naniesionym inokulum badanego drobnoustroju umieść wcześniej przygotowane paski bibuły nasączone antybiotykami pod kątem prostym względem siebie, stykające się.
2. Pozostaw paski bibuły z antybiotykami na kilka godzin w celu dyfuzji w podłożu.
3. Inkubuj płytki przez 18–24 godzin w temperaturze 37°C (Laishram *i wsp.* 2017).
 - 3.1. Możliwą alternatywą jest nałożenie pasków nasączonych antybiotykiem na czyste podłoże MHA na 24 godziny w celu dyfuzji, a następnie naniesienie badanego szczepu za pomocą techniki transferu membranowego.
4. Interpretacja wyników.
 - 4.1. Za efekt addycji uznaje się występowanie dwóch owalnych obszarów zahamowania wzrostu wokół pasków z antybiotykami łączących się pod kątem prostym.
 - 4.2. Synergizm stwierdza się przy poszerzeniu lub obecności strefy zahamowania wokół kąta prostego.
 - 4.3. Antagonizm stwierdza się przy wcięciu lub zwężeniu stref zahamowania wzrostu wokół pasków z antybiotykami od strony kąta prostego pomiędzy paskami (Laishram *i wsp.* 2017).

Metoda ta jest kosztochłonna i pracochłonna, a wyniki uzyskane tą techniką są jedynie jakościowe.

Metoda warstwowa – procedura

1. Przygotuj podłoże agarowe, zawierające antybiotyk A w stężeniu równym połowie jego wartości MIC dla badanego szczepu (tzw. warstwa agaru bazowego) oraz jako podłoże kontrolne agar bez antybiotyku.
2. Nanieś warstwę inokulum (agaru bez antybiotyku) zawierającą 10⁶ CFU/ml badanego szczepu, na podłoże z antybiotykiem A oraz podłoże kontrolne.
3. Po zestaleniu agaru na płytce badanej i kontrolnej umieść na powierzchni krążki z antybiotykiem B w różnych stężeniach.
4. Inkubuj przez 24 godziny w temperaturze 37°C.
5. Interpretacja wyników:
 - 5.1. Synergizm stwierdza się przy wzroście średnicy strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów wokół krążka z antybiotykiem B o co najmniej 19% w stosunku do kontroli.
 - 5.2. Efekt addycji stwierdza się przy wzroście średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem B o mniej niż 19%.
 - 5.3. Brak zmian strefy zahamowania wzrostu wskazuje na brak działania połączeń stosowanych preparatów (Laishram *i wsp.* 2017).

8. Wnioski

Ze względu na dynamiczny wzrost poziomu antybiotykooporności drobnoustrojów i długi czas potrzebny do opracowania i dopuszczenia do praktyki klinicznej

nowego antybiotyku konieczne jest wprowadzanie do rutynowej praktyki diagnostycznej oceny działania połączeń antybiotyków. Opisano wiele metod badania synergizmu i addycji antybiotyków, które różnią się dostępnością odczynników i aparatury, trudnością i czasem wykonania, a także uzyskiwanymi wynikami i jednoznacznością ich interpretacji (Papoutsaki *i wsp.* 2020; Okoliegbe *i wsp.* 2021). Opisany w różnych badaniach poziom zgodności wymienionych tu metod jest znacząco różny, co może być związane z badanym szczepem bakterii, wykorzystywanymi antybiotykami czy nawet mechanizmami oporności. Gaudereto *i wsp.* w badaniu metod wykrywania synergizmu w przypadku wielolekoopornych pałeczek Gram-ujemnych uzyskali zgodność metody proporcji MIC:MIC i “time-kill” na poziomie 35–71% (Gaudereto *i wsp.* 2020). Wydaje się, że jednoznaczne porównanie poszczególnych metod w sposób uniwersalny wobec różnych antybiotyków oraz szczepów bakterii aktualnie pozostaje poza granicami możliwości badaczy (Doern 2014).

Obecnie “złotym standardem” badania połączeń antybiotyków pozostaje metoda “time-kill”, która dostarcza dodatkowo informacji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym w różnych punktach czasowych i stanowi wiarygodny punkt odniesienia dla różnych procedur. Test “time-kill” jest jednak metodą czasochłonną i relatywnie trudną metodologicznie, przez co atrakcyjną alternatywą wydają się przede wszystkim metody wykorzystujące paski z gradientami stężeń. Konieczna jest jednak walidacja uzyskiwanych dzięki nim wyników, tak aby były one jak najbardziej wiarygodne.

Oprócz rutynowego badania synergizmu i addycji w działaniu antybiotyków potrzebne jest jednak opracowywanie nowych metod możliwych do wdrożenia w praktyce diagnostycznej i, w efekcie, klinicznej. Obiecującą procedurą wydaje się metoda CombiANT, która dzięki możliwości szybkiego oznaczenia kombinacji trzech par leków, łatwej interpretacji wyników oraz dokładności porównywalnej do metody mikrorozcieńczeń w bulionie może być w niedalekiej przyszłości metodą o dużym znaczeniu diagnostycznym (Fatsis-Kavalopoulos *i wsp.* 2020).

Test szachownicy, najpopularniejsza metoda badania synergizmu, jako modyfikacja oznaczania MIC antybiotyku w bulionie jest procedurą intuicyjną i łatwo dostępną ze względu na szeroki dostęp do potrzebnej do wykonania badania aparatury i odczynników. W przeciwieństwie do metody “time-kill” dostarcza jednak informacji wyłącznie o efekcie bakteriostatycznym, co jest ograniczeniem mogącym mieć wpływ na dalsze postępowanie kliniczne.

Najbardziej dostępne, najłatwiejsze i najtańsze są metody wykorzystujące paski z gradientami stężeń antybiotyków. Pilnie potrzebna jest walidacja ich metodologii i konieczność wprowadzenia jednolitych kryteriów interpretacji uzyskanych wyników. W niektórych sytuacjach metody paskowe mogą być jedyną

możliwą do wykonania procedurą, dlatego tym bardziej potrzebne są dalsze badania porównawcze względem innych metod, które pozwolą wprowadzić je do rutynowej praktyki diagnostycznej, a w efekcie klinicznej. Ważne jest przedstawienie zróżnicowania wiarygodności wyników poszczególnych procedur z zastosowaniem pasków z gradientami stężeń, spośród których metoda proporcji MIC:MIC wydaje się być najbardziej rzetelna (Okoliege i wsp. 2021).

ORCID

Paweł Z. Kmiecikowski <https://orcid.org/0009-0004-1315-7194>

Aniela Gabriel <https://orcid.org/0009-0006-6193-5610>

Dagmara Depka <https://orcid.org/0000-0003-2387-9778>

Tomasz Bogiel <https://orcid.org/0000-0001-6787-1378>

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych powiązań finansowych ani osobistych z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść niniejszej publikacji i/lub rościć sobie prawa autorskie do tej publikacji.

Piśmiennictwo

- Bellio P., Fagnani L., Nazzicone L., Celenza G.: New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, **8**, 101543 (2021)
- Brennan-Krohn T., Kirby J.E.: When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. *Clin. Lab. Med.* **39**, 345–358 (2019a)
- Brennan-Krohn T., Kirby J.E.: Antimicrobial Synergy Testing by the Inkjet Printer-assisted Automated Checkerboard Array and the Manual Time-kill Method. *J. Vis. Exp.* **146**, 10.3791/58636 (2019b)
- Brennan-Krohn T., Truelson K.A., Smith K.P., Kirby J.E.: Screening for synergistic activity of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae using inkjet printer-based technology. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2775–2781 (2017)
- Doern C.D.: When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 4124–8 (2014)
- https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Break_point_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. 19.05.2024
- <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases, 13.04.2024
- Fatsis-Kavalopoulos N., Roemhild R., Tang P.-C., Kreuger J., Andersson D.I.: CombiANT: Antibiotic interaction testing made easy. *PLOS Biol.* **18**, e3000856 (2020)
- Gaudereto J.J., Neto L.V.P., Leite G.C., Espinoza E.P.S., Martins R.C.R., Prado G.V.B., Rossi F., Guimarães T., Levin A.S., Costa S.F.: Comparison of methods for the detection of in vitro synergy in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiol.* **20**, 97 (2020)
- Garbusińska A., Szliszka E.: Aktywność leków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w kombinacjach wobec pałeczek Gram-ujemnych w badaniach *in vitro*. *Post. N. Med.*, **XXX(08)**, 427–433 (2017)
- Guzek A.: Metodologia oznaczania synergizmu między antybiotykami z zastosowaniem pasków z gradientem stężeń antybiotyków w warunkach *in vitro*. *Forum Zakażeń*, **14**, 19–24 (2023)
- Karakonstantis S., Ioannou P., Kofteridis D.D.: In search for a synergistic combination against pandrug-resistant *A. baumannii*; methodological considerations. *Infection*, **50**, 569–581 (2022)
- Laishram S., Pragasam A.K., Bakthavatchalam Y.D., Veerarghavan B.: An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J. Med. Microbiol.* **35**, 445–468 (2017)
- Marie M.A.M., Krishnappa L.G., Alzahrani A.J., Mubarak M.A., Alyousef A.A.: A prospective evaluation of synergistic effect of sulbactam and tazobactam combination with meropenem or colistin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **15**, 24–29 (2015)
- Nasomsong W., Nulsopapon P., Changpradub D., Pungcharoenkijkul S., Hanyanunt P., Chatreewattanukul T., Santimaleeworagun W.: Optimizing Doses of Ceftolozane/Tazobactam as Monotherapy or in Combination with Amikacin to Treat Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, **11**, 517 (2022)
- Okoliege I.N., Hijazi K., Cooper K., Ironside C., Gould I.M.: Antimicrobial Synergy Testing: Comparing the Tobramycin and Ceftazidime Gradient Diffusion Methodology Used in Assessing Synergy in Cystic Fibrosis-Derived Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, **10**, 967 (2021)
- Papoutsaki V., Galani I., Papadimitriou E., Karantani I., Karaïssos I., Giamarellou H.: Evaluation of in vitro methods for testing tigecycline combinations against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Global Antimicrob. Resist.* **20**, 98–104 (2020)
- <https://pharmaceutical-journal.com/article/news/only-12-new-antibiotics-entered-the-market-in-five-years-who-warns-in-review> Sayburn A.: Only 12 new antibiotics entered the market in five years, WHO warns in review. *The Pharmaceutical Journal*, **310** (2023), 04.12.2024
- Sreenivasan P., Sharma B., Kaur S., Rana S., Biswal M., Ray P., Anurup A.: In-vitro susceptibility testing methods for the combination of ceftazidime-avibactam with aztreonam in metallo-beta-lactamase producing organisms: Role of combination drugs in antibiotic resistance era. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **75**, 454–462 (2022)
- Tang P.-C., Sánchez-Hevia D.L., Westhoff S., Fatsis-Kavalopoulos N., Andersson D.I.: Within-species variability of antibiotic interactions in Gram-negative bacteria. *mBio*, **15**, e0019624 (2024)
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354545/9789240047655-eng.pdf?sequence=1>. WHO. World Health Organization: 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis, 13.04.2024
- https://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/Biuletyn/Biuletyn-Informacyjny-2_2022.pdf Żabicka D., Grzegorzczak M.: Oporność na antybiotyki w Polsce i Europie w 2021 roku – dane sieci EARS-Net. *Oporność na antybiotyki. Biuletyn informacyjny*, **2** (2022), 19.05.2024