MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2009, 61: 367 - 374

Tomasz Bogiel, Aleksander Deptuła, Eugenia Gospodarek

OCENA AKTYWNOŚCI DORIPENEMU WOBEC PAŁECZEK Z RODZAJÓW *PSEUDOMONAS SP*. I *ACINETOBACTER SP*.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: dr hab. *Eugenia Gospodarek*, prof. UMK

Przeprowadzono analizę aktywności doripenemu - nowego antybiotyku z grupy karbapenemów wobec szczepów pałeczek niefermentujących izolowanych z materiału pobranego od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy. Ogółem oznaczono lekowrażliwość 176 (74,9%) szczepom *Pseudomonas sp.* i 59 (25,1%) szczepom *Acinetobacter sp*. Odsetek szczepów opornych na doripenem był wyższy w przypadku pałeczek *Acinetobacter* (39,0%) w porównaniu z *Pseudomonas* (28,4%).

Doripenem jest nowym antybiotykiem z grupy karbapenemów, zarejestrowanym do leczenia u dorosłych pacjentów powikłanych zakażeń w obrębie jamy brzusznej, układu moczowego, odmiedniczkowego zapalenia nerek oraz szpitalnych zapaleń płuc, w tym związanych z mechaniczną wentylacją (14, 18). Niefermentujące pałeczki z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* należą do najczęściej izolowanych bakterii z przypadków zakażeń szpitalnych (6).

Doripenem, najnowszy antybiotyk z grupy beta-laktamów, strukturalnie podobny jest do penicylin. Jego zakres działania jest zbliżony do meropenemu i imipenemu (9). Doripenem wykazuje aktywność *in vitro* wobec pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym także wobec producentów beta-laktamaz o rozszerzonym zakresie działania i szczepów z derepresją AmpC, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* sp. (3, 12, 13, 18). W jego penetrację do komórki bakteryjnej, podobnie jak w przypadku pozostałych karbapenemów, zaangażowane jest białko OprD, którego utrata skutkuje podwyższeniem wartości najmniejszego stężenia doripenemu hamującego namnażanie drobnoustrojów dla (16). Doripenem wykazuje duże powinowactwo do białek wiążących penicyliny (Penicillin Binding Proteins, PBP), zwłaszcza do PBP2, którego blokowanie prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. Wyższy stopień powinowactwa w stosunku do imipenemu, ceftazydymu i aztreonamu, a zbliżony do meropenemu jest odpowiedzialny za szeroki zakres działania przeciwbakteryjnego doripenemu wobec bakterii Gram-ujemnych (5).

Pałeczki niefermentujące z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* mieszczą się w zakresie aktywności doripenemu, jednak mogą wykazywać nabytą oporność na ten lek spowo-

dowaną zmianą przepuszczalności osłon komórkowych lub wytwarzaniem karbapenemaz - enzymów hydrolizujących karbapenemy (12, 14). Stąd, ważne jest wczesne rozpoznanie zakażenia i szybkie wprowadzenie antybiotykoterapii celowanej. W trudnych przypadkach klinicznych doripenem powinien być zarezerwowany do leczenia ciężkich zakażeń o mieszanej etiologii oraz wywoływanych przez wielolekooporne szczepy pałeczek Gram-ujemnych i *P. aeruginosa* (14), którym często towarzyszy wysoki poziom śmiertelności (2).

Celem pracy była ocena aktywności doripenemu wobec szczepów pałeczek niefermentujących izolowanych od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dra A. Jurasza w Bydgoszczy.

MATERIAŁ I METODY

Od czasu wprowadzenia w naszym laboratorium doripenememu do oznaczania lekowrażliwości, tj. od lutego 2009 roku do końca września 2009 roku, oceniono aktywność tego antybiotyku w stosunku do 311 szczepów pałeczek niefermentujących – 232 (74,6%) z rodzaju *Pseudomonas* i 79 (25,4%) z rodzaju *Acinetobacter* izolowanych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii z materiału pobranego od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dra A. Jurasza w Bydgoszczy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Do badań wykorzystano 235 szczepów zidentyfikowanych pałeczek niefermentujących, wykluczając powtarzające się izolaty – szczepy tego samego gatunku o tym samym fenotypie oporności izolowane od tego samego pacjenta. Łącznie w badaniach uwzględniono 176 (74,9%) szczepów *Pseudomonas sp*. i 59 (25,1%) *Acinetobacter sp*. izolowanych odpowiednio, od 139 i 48 chorych.

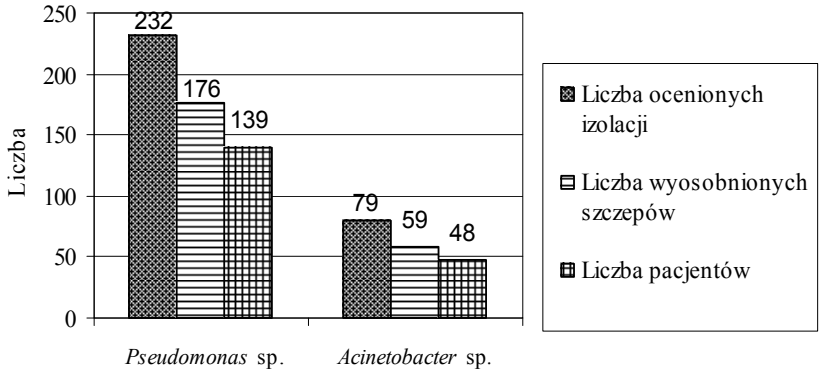
Identyfikację gatunkową przeprowadzano w oparciu o morfologię kolonii na agarze z 5% krwią baranią (Tryptase-Soy Agar, Becton Dickinson) oraz na podłożu MacConkey Agar (bioMérieux). W przypadku *Pseudomonas sp*. oceniano zdolność do wzrostu na podłożu z cetrymidem (PseudoSel Agar, Becton Dickinson), wytwarzanie barwników i oksydazy. Wykorzystano wyniki reakcji biochemicznych badanych bakterii ujętych w testach ID 32 GN (bioMérieux) wykonywanych zgodnie z zaleceniami producenta i odczytywanych w systemie komputerowym ATB Expression V 2.8.8 (bioMérieux).

Lekowrażliwość izolowanych szczepów oceniano zgodnie z zaleceniami Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (17) i Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) (8) metodą krążkowo-dyfuzyjną, w stosunku do następujących antybiotyków: piperacylina (100 µg), ceftazydym (30 µg), tikarcylina/kwas klawulanowy (75/10 µg), piperacylina/tazobaktam (100/10 µg), cefepim (30 µg), aztreonem (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), doripenem (10 µg), amikacyna (30 µg), gentamycyna (10 µg), netilmycyna (30 µg), tobramycyna (10 µg), ciprofloksacyna (5 µg), lewofloksacyna (5 µg), kolistyna (50 µg) (Becton Dickinson) dla szczepów *Pseudomonas* sp. i dodatkowo: ampicylina/sulbaktam (10/10 µg), cefotaksym (30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg) i chloramfenikol (30 µg) (Becton Dickinson) dla szczepów *Acinetobacter* sp. Do oceny lekowrażliwości wykorzystano podłoże Mueller-Hinton Agar (Mueller-Hinton II Agar, MHA, Becton Dickinson) oraz zawiesinę bakterii w 0,9% roztworze NaCl o gęstości 0,5 według skali MacFarlanda, wykonaną z 18-20 godzinnych hodowli na

agarze z krwią baranią. W celu kontroli poprawności oznaczania lekowrażliwości stosowano szczepy wzorcowe z kolekcji ATCC: *P. aeruginosa* 27853 i *Escherichia coli* 25922.

WYNIKI

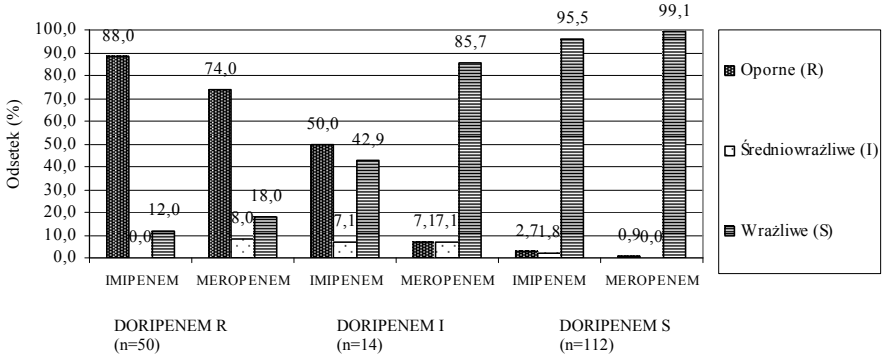
W okresie objętym badaniem izolowane bakterie rodzaju *Pseudomonas* stanowiły 74,9% szczepów w nim ujętych. Liczbę badanych izolacji, szczepów oraz pacjentów, od których pochodziły pałeczki niefermentujące ujęte w niniejszej ocenie wrażliwości na karbepenemy przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Udział poszczególnych rodzajów pałeczek niefermentujących w badaniu

Najczęściej izolowanym gatunkiem był *P. aeruginosa* (71,4%), następnie *A. baumannii* (20,9%). Informacje o izolowanych szczepach łącznie z ich procentowym udziałem w każdym fenotypie wrażliwości na doripenem zostały zestawione w tabeli I.

Lekowrażliwość badanych szczepów *Pseudomonas sp*. i *Acinetobacter sp.* w stosunku do karbapenemów zostały przedstawione odpowiednio, na rycinie 2 i 3.

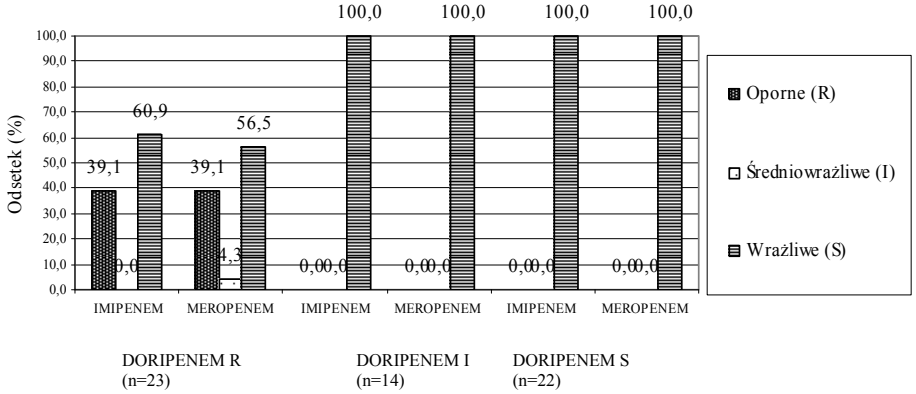


Ryc. 2. Wrażliwość na imipenem i meropenem badanych szczepów *Pseudomonas sp.* (n=176) o różnych fenotypach wrażliwości na doripenem

Tabela I. Podział badanych szczepów pałeczek niefermentujących ze względu na gatunek i fenotypy wrażliwości na doripenem

Pseudomonas sp.			
Fenotyp wrażliwości na doripenem	Gatunek	Liczba szczepów	Odsetek szczepów
Wrażliwe	*P. aeruginosa*	107	60,8
	P. stutzeri	2	1,1
	P. putida	1	0,6
	P. fluorescens	1	0,6
	Pseudomonas sp.	1	0,6
	Ogółem	112	63,6
Średniowrażliwe	*P. aeruginosa*	13	7,4
	P. fluorescens	1	0,6
	Ogółem	14	8,0
Oporne	*P. aeruginosa*	48	27,3
	P. fluorescens	1	0,6
	Pseudomonas sp.	1	0,6
	Ogółem	50	28,4
Badane szczepy		176	100,0
Liczba chorych		139	
Acinetobacter sp.			
Fenotyp wrażliwości na doripenem	Gatunek	Liczba szczepów	Odsetek szczepów
Wrażliwe	*A. baumannii*	14	23,7
	A. junii	5	8,5
	A. lwoffii	2	3,4
	A. haemolyticus	1	1,7
	Ogółem	22	37,3
Średniowrażliwe	*A. baumannii*	14	23,7
Oporne	*A. baumannii*	21	35,6
	A. junii	2	3,4
	Ogółem	23	39,0
Badane szczepy		59	100,0
Liczba chorych		48	

Wrażliwość na doripenem obserwowano wśród 63,6% szczepów *Pseudomonas sp*. i 37,3% *Acinetobacter sp*. Wrażliwe na doripenem pałeczki *Pseudomonas sp*. najczęściej były wrażliwe na pozostałe karbapenemy: imipenem (95,5%) i meropenem (99,1%). Natomiast niektóre szczepy tego rodzaju oporne na nowy karbapenem pozostawały wrażliwe na dotychczas stosowane – 12,0% i 18,0% odpowiednio, dla imipenemu i meropenemu. Odnotowano, że szczepy *Acinetobacter sp*. wrażliwe, jak i średnio wrażliwe na doripenem zawsze były wrażliwe na imipenem i meropenem.



Ryc. 3. Wrażliwość na imipenem i meropenem badanych szczepów *Acinetobacter sp.* (n=59) o różnych fenotypach wrażliwości na doripenem

DYSKUSJA

Doripenem jako nowy antybiotyk z grupy karbapenemów wydaje się obiecujący ze względu na podobną do meropenemu aktywność w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (18) i podobną do imipenemu wobec bakterii Gram-dodatnich (7). Potencjalne korzyści z jego stosowania wynikają z nieco lepszej aktywności *in vitro* w stosunku do *P. aeruginosa* i przedstawicieli rodzaju *Acinetobacter*, włączając szczepy karbapenemooporne (1). Jednak kliniczne znaczenie tych danych wymaga przeprowadzenia doświadczeń i potwierdzenia skuteczności (10). Według danych z piśmiennictwa szczepy oporne na karbapenemy wykazują zwykle oporność na doripenem (12, 14). Według innych doniesień karbapenemooporne szczepy *Acinetobacter sp*. i *P. aeruginosa* pozostają wrażliwe na doripenem odpowiednio, w 20,8% i 29,4% (11). Badania *Greer* (9) wskazują, że doripenem może także wykazywać aktywność *in vitro* w stosunku do 29% szczepów *P. aeruginosa* opornych na karbapenemy, chociaż trudno określić kliniczne implikacje tego faktu.

Według piśmiennictwa odsetek szczepów *P. aeruginosa* wrażliwych na doripenem wynosi 40,0-82,9% (3, 4). Z badań własnych wynika, że 63,6% szczepów *Pseudomonas* sp. i 37,3% przedstawicieli *Acinetobacter* spp. było wrażliwych na ten karbapenem. Ponadto, w wyniku prowadzonych badań stwierdzono, że wrażliwe na doripenem pałeczki *Pseudomonas sp.* najczęściej były jednocześnie wrażliwe na pozostałe karbapenemy: imipenem (95,5%) i meropenem (99,1%). Natomiast niektóre szczepy tego rodzaju oporne na nowy karbapenem pozostawały wrażliwe na dotychczas stosowane – 12,0% i 18,0% odpowiednio, dla imipenemu i meropenemu.

Według piśmiennictwa wartości MIC doripenemu dla *Acinetobacter sp*. są zbliżone do wartości MIC imipenemu, meropenemu, także w przypadku szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy (21). Podobne wyniki otrzymano dla szczepów tego rodzaju wytwarzających karbapenemazy (15).

Wartości MIC doripenemu w przypadku *P. aeruginosa* są niższe bądź równe wartościom dla pozostałych karbapenemów, natomiast znacznie wyższe w przypadku szczepów

opornych na karbapenemy, w tym wytwarzających metalo-beta-laktamazy (9). Według innych danych (18, 21) wartości te są znacznie niższe, zarówno dla szczepów *P. aeruginosa* opornych i wrażliwych na karbapenemy, jak izolowanych od chorych z mukowiscydozą (4). Wyniki te potwierdzają badania porównujące wartości MIC doripenemu i innych antybiotyków w stosunku do szczepów izolowanych od chorych z mukowiscydozą i innymi schorzeniami. Wyższe wartości MIC dla obydwu grup pacjentów były charakterystyczne dla imipenemu, piperacyliny, ceftazydymu, aztreonamu i cefepimu (19). Niższe wartości MIC dla doripenemu notuje się wśród szczepów *P. aeruginosa* opornych na imipenem, ceftazydym i gentamycynę (20).

Istnieją hipotezy zakładające skuteczność doripenemu użytego do leczenia zakażeń szczepami *P. aeruginosa* o wysokim stopniu oporności, chociaż badania wskazują na podobny do meropenemu zakres aktywności i fakt, że różnice we wzorach wrażliwości szczepów *P. aeruginosa* mogą nie mieć przełożenia na klinicznie znaczące korzyści (16).

W piśmiennictwie brak danych, zarówno na temat skuteczności doripenemu w leczeniu zakażeń o etiologii pałeczek niefermentujących w Polsce, jak i jego aktywności wobec szczepów w warunkach *in vitro*. Jednak nieracjonalne stosowanie antybiotyków może doprowadzić do sytuacji, w której zabraknie skutecznych leków i doripenem okaże się jedną z niewielu opcji terapeutycznych (2).

WNIOSKI

1. Doripenem wykazuje wyższą aktywność w stosunku do pałeczek *Pseudomonas sp.* (63,6%) w porównaniu ze szczepami *Acinetobacter sp*. (37,3%).
2. Wrażliwości i średniej wrażliwości na doripenem szczepów rodzaju *Acinetobacter* towarzyszy zawsze wrażliwość na dotychczas stosowane karbapenemy - imipenem i meropenem. Oporność na imipenem i meropenem występuje jednocześnie u 39,1% szczepów tego rodzaju opornych na doripenem.
3. Szczepy *Pseudomonas sp*. wrażliwe na doripenem wykazywały w 3,6% oporność lub obniżoną wrażliwość na imipenem. W przypadku jednego szczepu opornego na imipenem i meropenem, doripenem był jedynym możliwym do zastosowania lekiem z grupy karbapenemów.
4. Szczepy rodzaju *Pseudomonas* oporne na doripenem zachowują wrażliwość na imipenem (12,0%) i meropenem (18,0%).

T. Bogiel, A. Deptuła, E. Gospodarek

ACTIVITY OF DORIPENEM AGAINST *PSEUDOMONAS* SPP. AND *ACINETOBACTER* SPP. RODS

SUMMARY

Doripenem, the newest carbapenem was approved in 2008 by the European Medicines Agency for the treatment of complicated intra-abdominal infections and complicated urinary tract infections. Its spectrum of activity is similar to that of meropenem and imipenem/cilastatin. The aim of this study

was to compare *in vitro* activity of doripenem against nonfermentative Gram-negative rods. A total of 235 strains of *Pseudomonas* spp. (74,9%) and *Acinetobacter* spp. (25,1%) were included into the study. Strains were isolated in The Department of Clinical Microbiology of the University Hospital No 1 in Bydgoszcz and identified using ID GN tests (bioMérieux). To determine susceptibility to doripenem and other carbapenems disc-diffusion method was applied. Percentage of doripenem resistant strains reached 28,4% and 39,0% for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp, respectively. All doripenem sensitive or intermediate *Acinetobacter* spp. strains were simultaneously sensitive to imipenem and meropenem. Activity of imipenem and meropenem among doripenem resistant *Acinetobacter* spp. were represented by 60,9% and 56,5% strains, respectively. Activity of imipenem and meropenem among doripenem resistant *Pseudomonas* spp. strains were represented by 12,0% and 18,0%, respectively. Occurence of one doripenem sensitive *Pseudomonas* spp. strain simultaneously resistant to imipenem and meropenem was observed.

PIŚMIENNICTWO

1. *Anderson DL*. Doripenem. Drugs Today 2006; 42: 399–404.
2. *Bassetti M*. Strategies for management of "difficult to treat" Gram-negative infections: focus on *Pseudomonas aeruginosa***.** Infez Med 2007; 15: 20-6.
3. *Castanheira M, Jones RN, Livermore DM*. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63:, 426-33.
4. *Chen Y, Garber E, Zhao Q* i inni. *In vitro* activity of doripenem (S-4661) against multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2510–1.
5. *Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK*. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 1510–2.
6. *Dzierżanowska D*. Patogeny zakażeń szpitalnych. W: Zakażenia szpitalne. Red. D. Dzierżanowska, a-medica press, Bielsko-Biała 2007, 9-113.
7. *Ge Y, Wikler MA, Sahm DF* i inni. *In vitro* antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1384–96.
8. *Gniadkowski M, Żabicka D, Hryniewicz W*. Rekomendacje doboru testów do oznaczania lekowrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki - 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych 2009: 1-29.
9. *Greer ND*. Doripenem (Doribax): the newest addition to the carbapenems. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2008; 21: 337-41.
10. *Hilas O, Ezzo DC, Jodlowski TZ*. Doripenem (Doribax), a new carbapenem antibacterial agent. Drug Forecast 2008; 33: 134-80.
11. *Jones RN, Huynh HK, Biedenbach DJ*. Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3136–40.
12. *Livermore DM*. Doripenem: antimicrobial profile and clinical potential. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63: 455-8.
13. *Marti S, Sánchez-Céspedes J, Alba V, Vila J*. In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 181-2.
14. *Matthews SJ, Lancaster JW*. Doripenem monohydrate, a broad-spectrum carbapenem antibiotic. Clin Ther 2009; 31: 42-63.
15. *Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM*. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1313–9.

16. *Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM*. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa in vitro*: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. Antimicrob AgentsChemother 2004; 48: 3086–92.
17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 2008.
18. *Pillar CM, Torres MK, Brown NP* i inni. In vitro activity of doripenem, a carbapenem for the treatment of challenging infections caused by Gram-negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 4388-99.
19. *Traczewski MM, Brown SD. In vitro* activity of doripenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* isolates from both cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 819–21.
20. *Tsuji M, Ishii Y, Ohno A* i inni. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of S-4661, a new carbapenem. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 94–9.
21. *Walsh F*. Doripenem: a new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. Ther Clin Risk Manag. 2007; 3: 789–94.

Otrzymano: 17 XI 2009 r.

Adres Autora: 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu