MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 55 - 62

Indukcja *in vitro* oporności u *Acinetobacter baumannii* na sulbaktam i cefoperazon

In vitro resistance development in *Acinetobacter baumannii* to sulbactam and cefoperazone

Piotr Wieczorek[1], Paweł Sacha[1], Dominika Ojdana[1], Robert Milewski[2], Anna Jurczak[3], Katarzyna Kaczyńska[3], Elżbieta Tryniszewska[1]

[1]Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
[2]Zakład Statystyki i Informatyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
[3]Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

Szpitalne szczepy *Acinetobacter baumannii* są wysoce oporne na wiele grup antybiotyków, czyniąc leczenie infekcji klinicznym wyzwaniem. Celem pracy była ocena stopnia indukcji oporności na sulbaktam, cefoperazon oraz cefoperazon w połączeniu z sulbaktamem u *Acinetobacter baumannii* po zastosowaniu różnych stężeń w zależności od wyjściowych wartości MIC dla tych antybiotyków. Seryjne pasaże w obecności antybiotyków powodowały u większości szczepów trwałe podwyższenie wartości MIC.

ABSTRACT

Introduction. Majority of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains are highly resistant to many available groups of antibiotics, causing therapy of infections the clinical challenge. The aim of study was to estimate of resistance development to sulbactam, cefoperazone and cefoperazone/sulbactam in *Acinetobacter baumannii* clinical strains.
Methods. Five *Acinetobacter baumannii* strains (Acb1, Acb2, Acb4, Acb13 and Acb25) were identified by the VITEK 2 GN card and the automatic system VITEK 2 according to the procedure and following the producer`s instructions. Additionaly, the belonging of the strains to the species was confirmed by the presence of the $bla_{\text{OXA-51-like}}$ gene. Initial and after antibiotic exposure MIC values of sulbactam, cefoperazone and cefoperazone/sulbactam were determined by using a broth microdilution method. Antibiotic pressure of examined strains was performed in Mueller-Hinton broth containing 0,5x, 0,9x and 2x initial MIC of individual compounds during six-day passages and next six-day passages without antibiotic presence. The Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis non-prarametric Anova test were used to statistical analysis.

Results. Serial passaging of *Acinetobacter baumannii* strains in the presence of antibiotics caused permanent increasing MIC value independently of used concentrations in the majority of examined strains. The highest MIC value increase of sulbactam was found in Acb4 strain. Even after two passages this isolate changed MIC from 0,5 μg/ml to 4 μg/ml (increase about four levels of concentration). Moreover, after incubation in 0,9xMIC concentration similar observation was noted. No normalization of MIC value of sulbactam after incubation during next six passages without sulbactam was observed. In case of cefoperazone the highest levels of induction were noted in Acb1, Acb13 and Acb25 strains. In these strains, after two passages in presence of cefoperazone (2xMIC) the exceedance of minimal of growth concentration over the highest examined concentration was observed. Similar effects were observed in Acb1 strain after stimulation with 0,9x and 0,5xMIC cefoperazone. Return of initial MIC values was received only after induction with 0,5xMIC cefoperazone. In some cases, no opportunities for evaluation of resistance development was noted, because during stimulation with 2xMIC of used antibiotics concentarations, bactericidal effect was found.
Conclusions. Sulbactam, cefoperazone and cefoperazone/sulbactam rapidly induce increasing of resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Statistically essential MIC increase after using higher concentration than lower was showed. This effect was particularly visible in the case of stimulation of cefoperazone/sulbactam combination.

WSTĘP

Pojawianie się wieloopornych bakterii Gram-ujemnych stanowi poważny problem współczesnej medycyny na całym świecie (12). Oporność na wiele grup antybiotyków u niektórych gatunków w rodzaju *Acinetobacter* i *Pseudomonas* jest szczególnym wyzwaniem antybiotykoterapii (13). Liczba izolacji wieloopornych *Acinetobacter baumannii* stale wzrasta od kilku lat, a leczenie zakażeń tymi pałeczkami należy do szczególnie trudnych problemów antybiotykoterapii (5). Do chwili obecnej, wiele szczepów *A. baumannii* wykorzystując różne mechanizmy oporności staje się opornymi na prawie wszystkie dostępne antybiotyki, włączając w to karbapenemy, które wcześniej uważano za lek z wyboru do leczenia infekcji *A. baumannii* (18, 20).

Klinicznie dostępne inhibitory β-laktamaz (kwas klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam) charakteryzują się zazwyczaj niewielką aktywnością przeciwbakteryjną. Synergistyczne działanie w połączeniu z antybiotykami β-laktamowymi przejawia się wzrostem aktywności preparatów skojarzonych oraz obniżeniem minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii. Sulbaktam w przeciwieństwie do pozostałych inhibitorów β-laktamaz charakteryzuje się wyjątkową bezpośrednią aktywnością przeciwbakteryjną wobec szczepów *Acinetobacter* sp. oraz *Bacteroides fragilis* (10).

Celem pracy była ocena wartości MIC sulbaktamu, cefoperazonu i cefoperazonu w połączeniu z sulbaktamem u szczepów *Acinetobacter baumannii* w trakcie inkubacji w różnych stężeniach powyższych czynników.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. W badaniu wykorzystano 5 szczepów *Acinetobacter baumannii* (Acb1, Acb2, Acb4, Acb13, Acb25) wyizolowanych od pacjentów leczonych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Białymstoku. Szczepy zostały zidentyfikowane na podstawie cech biochemicznych przy użyciu karty VITEK 2 GN i automatycznego systemu VITEK 2 (bioMerieux) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Dodatkowo, w celu potwierdzenia wyniku identyfikacji wykorzystano zdolność wzrostu *A. baumannii* w temperaturze 44° C, oraz obecność naturalnie występujących u tego gatunku genów $bla_{\text{OXA-51-like}}$ karbapenemaz z grupy OXA-51 (17).

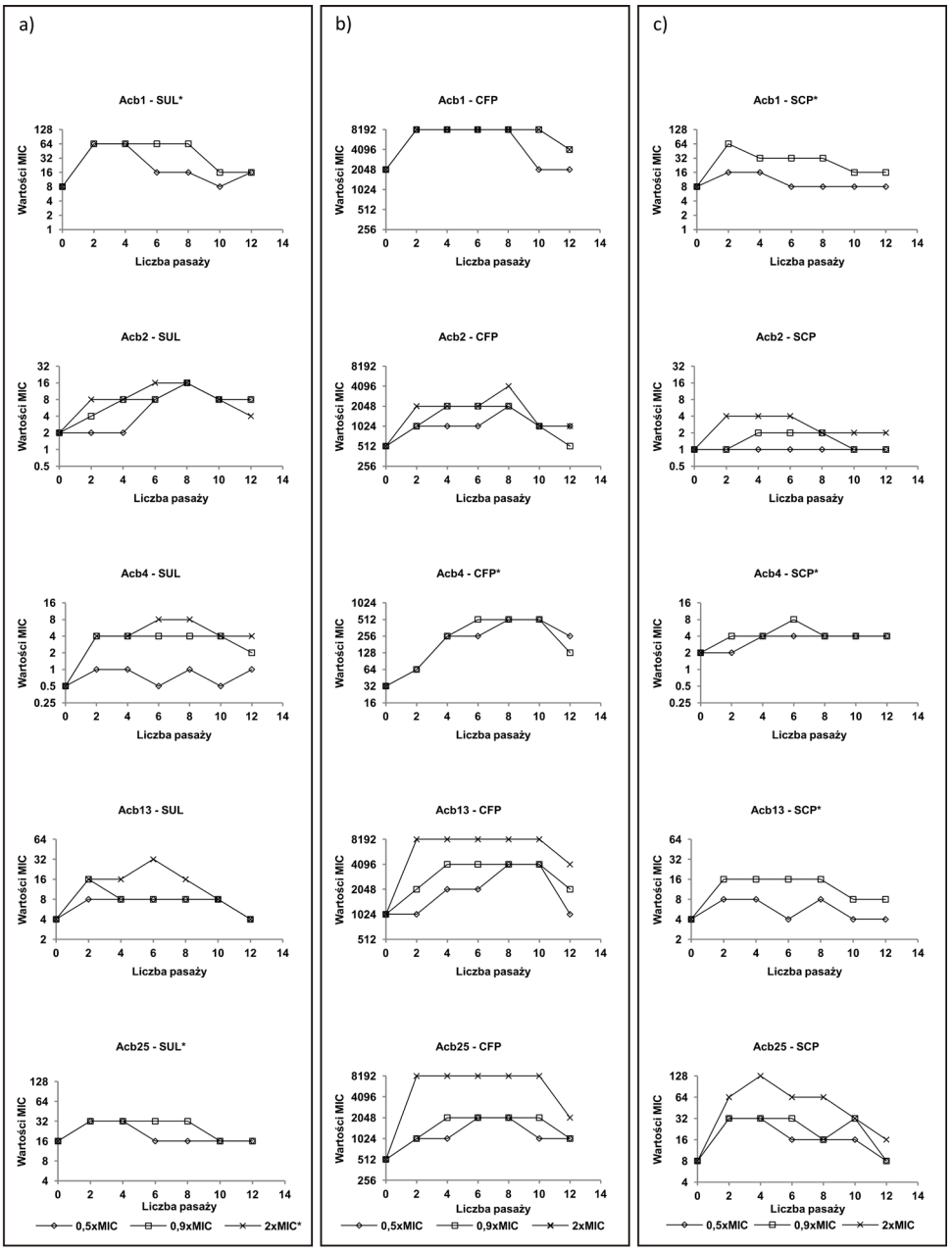
Seryjne pasaże. Przed rozpoczęciem seryjnych pasaży badanych szczepów w obecności antybiotyku oznaczono wyjściową wartość MIC sulbaktamu, cefoperazonu oraz cefoperazonu w połączeniu z sulbaktamem. Do oznaczania wartości MIC zastosowano metodę mikrorozcieńczeniową (2). Presję antybiotykową poszczególnymi substancjami wobec każdego ze szczepów wykonano w stężeniach: 0,5x, 0,9x oraz 2x wartości wyjściowej MIC w ciągu 6 kolejnych dni. Następnych 6 pasaży badanych szczepów wykonano bez dodatku antybiotyków. Seryjne pasaże przeprowadzono w bulionie Mueller-Hintona zgodnie z metodyką opisaną przez *Li* i wsp. (11). Pierwszego dnia do probówek zawierających odpowiednie stężenia antybiotyków w bulionie Mueller-Hintona (po 5 ml) zaszczepiono po jednej kolonii badanych szczepów. Hodowle inkubowano w temperaturze 37° C przy stałym wytrząsaniu (120 rpm). W celu wykonania kolejnych pasaży przenoszono po 50 µl hodowli do nowych probówek. Wartości MIC w trakcie prowadzonych pasaży oznaczano co drugi dzień także metodą mikrorozcieńczeniową. W badaniu wykorzystano sulbaktam dzięki uprzejmości firmy Pfizer Inc. (USA).

Analiza statystyczna. W analizie statystycznej do sprawdzenia zależności pomiędzy cechami zastosowano nieparametryczny test U *Manna-Whitneya* w przypadku dwóch grup oraz nieparametryczny test ANOVA rang *Kruskala-Wallisa* z testem post-hoc wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób w przypadku wielu prób. Wyniki istotne statystycznie uznano na poziomie $p<0,05$. W obliczeniach wykorzystano pakiet Statistica 8.0 firmy StatSoft.

WYNIKI

Sekwencja seryjnych pasaży *Acinetobacter baumannii* w obecności subinhibicyjnych stężeń (0,5x oraz 0,9x wyjściowej wartości MIC) oraz dwukrotnie wyższego (2x wartość MIC) stężenia sulbaktamu, cefoperazonu i cefoperazonu z sulbaktamem powodowała u większości szczepów podwyższenie MIC. Ocena indukcji była niemożliwa (brak wzrostu bakterii) w przypadku stymulacji stężeniami 2x wyjściowa wartość MIC dla sulbaktamu – szczep Acb1 i Acb25, dla cefoperazonu – Acb4 oraz dla cefoperazonu z sulbaktamem – Acb1, Acb4 i Acb13.

Na rycinie 1a przedstawiono zmianę wartości MIC w trakcie pasażowania szczepów z sulbaktamem. Najniższą wyjściową wartość MIC prezentował szczep Acb4 (0,5 µg/ml), zaś najwyższą szczep Acb25 (16 µg/ml). Najwyższy wzrost MIC w stosunku do wyjściowego odnotowano u Acb4, u którego doszło do zmiany wartości o 4 rzędy stężeń po sześciu



Ryc. 1. Zmiana wartości MIC u *Acinetobacter baumannii* w trakcie inkubacji w określonych stężeniach a) sulbaktamu, b) cefoperazonu c) cefoperazonu z sulbaktamem
SUL – sulbaktam, CFP – cefoperazon, SCP – cefoperazon z sulbaktamem, MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost, * – osiągnięty efekt bakteriobójczy po inkubacji w stężeniu 2x MIC wyjściowy (brak wzrostu bakterii)

pasażach z sulbaktamem (2x MIC). Izolat ten po dwóch pasażach hamowany był przez 4 μg/ml, podobnie jak po inkubacji w stężeniu 0,9x MIC. Pasaże bez obecności sulbaktamu po presji dwoma wyższymi stężeniami nie doprowadziły do normalizacji wartości MIC. Indukcja oporności u szczepu Acb4 w stężeniu 0,5x MIC nie miała tak wyraźnego wpływu jak stężenia opisane powyżej. Szczep Acb2 po 8 pasażach osiągnął jednakowy MIC (16 μg/ml) niezależnie od stężeń w jakich był inkubowany i także nie powrócił do pierwotnej wartości hamującej wzrost. Szczep Acb13 uzyskał wyjściową wartość MIC (niezależnie od stężeń presyjnych po 12 pasażach) mimo wzrostu do 32 μg/ml w trakcie indukcji stężeniem 2x. Wyjściowe wartości MIC osiągnął także szczep *A. baumannii* Acb25.

Pierwotne wartości hamujące wzrost wobec cefoperazonu dla większości szczepów wynosiły ≥512 μg/ml, za wyjątkiem szczepu Acb4 – 32 μg/ml. Najwyższy poziom indukcji po zastosowaniu cefoperazonu uzyskano u szczepu Acb1, Acb13 oraz Acb25 (Ryc. 1b). U tych szczepów już po 2 pasażach w obecności cefoperazonu (2x MIC) wartości stężenia hamującego wzrost wykroczyły poza najwyższe w szeregu stężeń zastosowanym do określenia MIC (> 4096 μg/ml). U szczepu Acb1 podobny efekt zaobserwowano także przy stężeniach 0,9x i 0,5x MIC, przy których przebieg indukcji oporności pokrywał się ze stężeniem indukcyjnym 2x MIC. Powrót wartości pierwotnych uzyskano na zakończenie indukcji tylko stężeniem 0,5x MIC. Podobnie poziom wartości MIC sprzed indukcji (0,5x MIC) stwierdzono także u szczepu Acb13.

Wpływ indukcji oporności na wartości MIC cefoperazonu w połączeniu z sulbaktamem przedstawiono na rycinie 1c. Najwyższy wzrost MIC w stosunku do pierwotnego odnotowano u szczepu Acb25, u którego po 4 pasażach stężenie 2x MIC podwyższyło minimalne stężenie hamujące do 128 μg/ml (4 rzędy stężeń). Najwyższy wzrost po dwóch pasażach stwierdzono u Acb1 oraz Acb25, u których wzrost następował z wartości 8 μg/ml do 64 μg/ml, ale przy różnych stężeniach wykorzystanych do indukcji – odpowiednio przy indukcji 0,9x MIC oraz 2x MIC. U szczepu Acb2 stymulacja cefoperazonem z sulbaktamem (0,5x MIC) nie spowodowała zmiany wartości MIC, a niewielki wpływ takiego stężenia (zmiany 1 rzędu stężeń) zaobserwowano u Acb1, Acb4 i Acb13 z częstym powrotem wartości wyjściowej. Powrót wartości wyjściowych na zakończenie cyklu pasaży stwierdzono po indukcji 0,9x MIC u Acb2 oraz Acb25. Z kolei bardzo zbliżony przebieg stymulacji dwoma stężeniami 0,5x oraz 0,9x MIC stwierdzono u szczepu Acb4.

Analiza statystyczna wykazała u szczepu Acb4 istotne statystycznie wyższe wartości MIC po zastosowaniu do indukcji wyższego stężenia sulbaktamu (2x MIC) w stosunku do obu niższych stężeń (0,9x i 0,5x MIC).Wartości p wynosiły odpowiednio 0,038 oraz 0,002. W przypadku indukcji cefoperazonem różnice istotne statystycznie dotyczyły stężenia 2x MIC wobec 0,5x MIC u dwóch szczepów – Acb13 i Acb25, u których wartości p wynosiły 0,005 oraz 0,007. U szczepu Acb25 dodatkowo różnice w indukcji stężeniem 0,9x MIC i 0,5x MIC były na granicy istotności statystycznej (p=0,06). Najwięcej różnic na poziomie istotności statystycznej stwierdzono w przypadku zastosowania cefoperazonu w połączeniu z sulbaktamem. U szczepów Acb1 i Acb13 różnice dotyczyły tylko stężeń subinhibicyjnych, a wartości p wynosiły 0,013 oraz 0,02. Natomiast u szczepów Acb2 i Acb25 różnice dotyczyły stężenia indukcyjnego 2x MIC oraz 0,5x MIC. Wykazane p=0,004 u pierwszego szczepu wskazywało na różnice istotnie statystycznie, zaś u drugiego były na granicy istotności statystycznej (p=0,055).

DYSKUSJA

Acinetobacter baumannii charakteryzuje się narastającą opornością na antybiotyki. W związku z faktem, że posiada on wrodzone mechanizmy oporności i może łatwo nabywać kolejne, czyni ten patogen jednym z najważniejszych mikrobiologicznych wyzwań współczesnej medycyny. Poszukiwania terapeutycznych opcji zakażeń wywoływanych także przez szczepy wielooporne (w tym oporne na karbapenemy) stawiają w kręgu zainteresowania sulbaktam (występujący w preparatach skojarzonych z ampicyliną lub cefoperazonem) jako alternatywne rozwiązanie w leczeniu takich zakażeń (9). Skojarzenie sulbaktamu z β-laktamami znacznie poprawia aktywność tych ostatnich, chociaż skuteczność tego połączenia w znacznej mierze może zależeć od działania samego sulbaktamu wobec *Acinetobacter baumannii* (10, 15, 16). Wykazywano w różnych regionach świata wysoką aktywność ampicyliny z sulbaktamem (66,5 % - 100 % szczepów wrażliwych) oraz cefoperazonu z sulbaktamem (73,8 % - 99,5 %) (3, 4, 10). Aktywność samych β-laktamów bez sulbaktamu może kształtować się na bardzo niskim poziomie ≤ 10% szczepów wrażliwych (< 5 % ampicylina, < 10 % cefoperazon) (3, 4). Wcześniejsze badania własne oceniające aktywność cefoperazonu z sulbaktamem wykazywały także wysoki odsetek szczepów *Acinetobacter baumannii* wrażliwych na to połączenie (ok. 90%), wobec niskiej aktywności samego cefoperazonu (>80 % szczepów opornych) (6).

Aktualne badanie miało na celu indukcję oporności po zastosowaniu różnych stężeń sulbaktamu, cefoperazonu i cefoperazonu z sulbaktamem oraz ocenę wartości MIC w zależności od liczby pasaży bakterii w obecności tych antybiotyków. Przebieg krzywych obrazujący zmiany wartości MIC u poszczególnych szczepów wskazuje na szybsze i wyższe podwyższenie wartości MIC w trakcie inkubacji w wyższych stężeniach antybiotyków (tj. 2x wartości MIC i ew. 0,9x MIC). Obserwowane różnice wyjściowych wartości MIC samego sulbaktamu wobec połączenia z cefoperazonem oraz samego przebiegu indukcji oporności mogą wynikać ze wzajemnych interakcji pomiędzy tymi składnikami. Opisywano zarówno korzystny synergizm, jak i niekorzystny antagonizm sulbaktamu po połączeniu z antybiotykami β-laktamowymi wobec niektórych szczepów *Acinetobacter baumannii*, co mogło wpływać na przebieg indukcji oporności w naszym przypadku (7, 8). Istotne mogą być także proporcje β-laktamu do sulbaktamu – stwierdzano wyższy odsetek szczepów opornych, kiedy zastosowano proporcje 2:1 w stosunku do 1:1 (cefoperazon:sulbaktam) (19).

O oporności na połączenia inhibitorów z β-laktamami mogą decydować różne mechanizmy. Większość bakterii z derepresją cefalosporynaz chromosomalnych (klasa C β-laktamaz) jest oporna na te kombinacje. Nadprodukcja enzymów klasy A (TEM-1 i TEM-2) lub produkcja enzymów z rodziny TEM i OXA, które nie są hamowane przez inhibitory β-laktamaz to kolejna przyczyna oporności. Nadprodukcja β-laktamaz pojawia się w wyniku punktowych mutacji w sekwencjach promotorowych genów kodujących enzymy TEM lub OXA, bądź też w wyniku pozyskiwania wielu kopii genów zlokalizowanych na plazmidach (1). W przypadku *Acinetobacter baumannii* tego typu mechanizmy (14), wytwarzanie oksacylinaz i nadprodukcja enzymów klasy C, z których często korzysta ten gatunek mogą odgrywać szczególną rolę we wzroście wartości MIC prowadzonej indukcji oporności.

WNIOSKI

1. Sulbaktam, cefoperazon i cefoperazon z sulbaktamem szybko indukują narastanie oporności u *Acinetobacter baumannii*.
2. Wykazano istotny statystycznie wzrost wartości MIC po zastosowaniu wyższych stężeń indukcyjnych względem niższych, szczególnie w przypadku jednoczesnej stymulacji cefoperazonem w połączeniu z sulbaktamem.

PIŚMIENNICTWO

1. *Akova M*. Sulbactam-containing β-lactamase inhibitor combinations, Clin Microbiol Infect 2008; 14: 185-8.
2. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1-7.
3. *Fu W* i inni. The susceptibility of non-fermentative Gram-negative bacilli to cefperazone and sulbactam compared with other antibacterial agents. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 444-8.
4. *Higgins PG* i inni. In vitro activities of the β-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1586-92.
5. *Jain R, Danziger LH*. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother 2004; 38: 1449-59.
6. *Jakoniuk P* i inni. Wrażliwość in vitro na cefoperazon/sulbaktam wieloopornych szczepów *Acinetobacter* spp. Zakażenia 2007; 2: 50-4.
7. *Kiffer CRV* i inni. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diag Microbiol Infect Dis 2005; 52: 317-22.
8. *Lee N-Y* i inni. Combination carbapenem-sulbactam therapy for critically ill patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: four case reports and an in vitro combination synergy study. Pharmacotherapy 2007; 27: 1506-11.
9. *Levin AS* i inni. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 58-62.
10. *Levin AS*. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 144-53.
11. *Li J* i inni. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2946-50.
12. *Livermore DM*. The need for new antibiotics. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (Suppl. 4): 1-9.
13. *Livermore DM*. The threat from the pink corner. Ann Med 2003; 35: 226-34.
14. *Peleg AY, Seifert H, Paterson DL*. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21: 538-82.
15. *Perez F* i inni. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3471-84.
16. *Tripodi MF* i inni. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. Int J Antimicrob Agents 2007; 30: 537-40.
17. *Turton JF* i inni. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the $bla_{\text{OXA-51-like}}$ carbapenemase gene intrinsic to this species, J Clin Microbiol 2006; 44: 2974-6.

18. *Van Looveren M, Goossens H*. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 684-704.
19. *Wang F-D* i inni. In vitro activities of β-lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2004; 23: 590-5.
20. *Wieczorek P* i inni. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* – the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochem Cytobiol 2008; 46: 257-67.

Otrzymano: 15 XII 2011 r.
Adres Autora: 15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 15A, Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej UM w Białymstoku
e-mail: piowie@umb.edu.pl