

**Actividad comparativa in vitro de Doripenem y otros carbapenemicos
frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Laboratorio de
Microbiología del Hospital Vargas de Caracas**

**Comparative in vitro activity of Dorypenem and other carbapenems in
Pseudomonas aeruginosa isolates on Vargas Caracas
Hospital's Microbiology Laboratory**

**Joseph G Campero R^{1*}, Cyndy L Figueredo D¹, Doryanna Correa¹, Luis C
Torres C²**

1. Laboratorio de Microbiología. Hospital Vargas de Caracas
2. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

*Correspondencia:

E-mail: Lcdocamperojoseph@hotmail.com

Telf.: 0412-8705589

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de un importante número de infecciones nosocomiales, puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica. Los antibióticos betalactámicos componen la familia más numerosa y utilizada en la práctica clínica, constituyen una opción terapéutica en infecciones producidas por bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa, como por ejemplo *P. aeruginosa*. En el Hospital Vargas de Caracas, laboratorio de Microbiología, según datos KERMIC en el año 2013 se obtuvieron aislamientos de *P. aeruginosa* con porcentajes de sensibilidad disminuida a los carbapenémicos de 61% a imipenem y 59% a meropenem. En el año 2007 la FDA y en 2008 la EMEA aprobaron el uso de un nuevo carbapenémico; doripenem, de amplio espectro con cobertura frente a Gram positivos, Gram negativos y anaerobios. El objetivo general de esta investigación fue analizar comparativamente la actividad de doripenem con otros carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio de microbiología del Hospital Vargas de Caracas. Se realizó a través del método de difusión en disco y la detección de MBLs por el test de EDTA; se encontraron porcentajes de sensibilidad similares para los tres carbapenémicos ensayados y un bajo porcentaje de cepas MBLs positivas.

Palabras clave: Carbapenémicos, Doripenem, Resistencia bacteriana, MBLs, Antibióticos betalactámicos, *P.aeruginosa*.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a significant number of nosocomial infections, can easily acquire resistance to most drugs in clinical use. Beta-lactam antibiotics comprise the largest and most used in clinical practice, they constitute a therapeutic option in infections by non-fermenting gram-negative bacilli of glucose, such as *P. aeruginosa*. In the Vargas Hospital of Caracas, microbiology laboratory, according KERMIC data in the year 2013 184 *P. aeruginosa* isolates with decreased sensitivity rates to carbapenems were obtained from 61% to 59% to imipenem and meropenem. In 2007 the FDA and EMEA in 2008 approved the use of a new carbapenems; doripenem, broad spectrum coverage against Gram positive, Gram negative and anaerobic. The overall objective of this research was to comparatively analyze the pattern of susceptibility doripenem with other carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the microbiology laboratory of the Vargas Hospital of Caracas. It was carried through the disk diffusion method and detecting MBLs by EDTA test; similar percentages of sensitivity for the three tested carbapenems and a low percentage of positive strains were found MBLs.

Key words: Carbapenems, Doripenem, Bacterial resistance, MBLs, Beta-lactam antibiotics, *P. aeruginosa*.

INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de un importante número de infecciones nosocomiales, especialmente neumonías asociadas a ventilación mecánica, bacteriemias, infecciones urinarias y de heridas quirúrgicas ⁽¹⁾. Este microorganismo puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica, a través de mutaciones en los genes codificantes o reguladores de los mecanismos involucrados en su resistencia natural, o a través de mecanismos enzimáticos con capacidad de hidrolizar antibióticos, por lo que la terapia empírica inicial suele incluir antimicrobianos de amplio espectro como los carbapenémicos (imipenem y meropenem) ^(2,3). Probablemente asociada a este uso habitual, la resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* se ha incrementado significativamente en los últimos años ^(3,12).

Los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos de amplio espectro y con actividad contra la mayoría de los patógenos. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, poseen acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, tienen buena distribución y escasa toxicidad ^(4,5). Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano como doripenem, un nuevo carbapenémico aprobado en el 2007 por la Food And Drug Administration (FDA) y posteriormente en el 2008 por la European Medicines Agency (EMA) para el tratamiento de neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica, infecciones intraabdominales complicadas e infecciones complicadas del tracto urinario ⁽⁶⁾.

Algunos estudios han demostrado que el doripenem tendría una mejor actividad que el imipenem frente a *P. aeruginosa*, incluyendo cepas con sensibilidad disminuida a imipenem. De corroborarse estas observaciones, el doripenem podría ampliar la cobertura antibiótica de la terapia empírica inicial frente a infecciones por *P. aeruginosa* ^(13,14)

En Venezuela no se cuenta con estudios previos que reflejen el comportamiento de doripenem en cepas de *P. aeruginosa*, por lo que con éste trabajo se pretende realizar una evaluación comparativa de la actividad *in vitro* a doripenem y otros carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* aislados en el Hospital Vargas de Caracas período Marzo 2013–Marzo 2014, que permitan establecer su posible eficacia terapéutica en las infecciones causadas por este

microorganismo, y así poder documentar la actividad de este fármaco que podría traer implicaciones favorables en la clínica.

MATERIALES Y METODOS

Se procesaron 95 aislados clínicos de *P. aeruginosa* (uno por paciente) obtenidas a partir de diversas muestras: secreciones (herida, quemadura, secreción abdominal, úlceras, piel y tejidos blandos) 48%, seguido de muestras del tracto respiratorio inferior (esputo, secreción bronquial, líquido pleural, lavado bronquial, secreción traqueal) 35 %, orinas 15 % y hemocultivos 2 %, de pacientes hospitalizados y ambulatorios de ambos sexos, y cualquier edad por lo que no se aplicó criterio de selección.

Se realizó la identificación de las cepas a partir de colonias aisladas, cultivadas en agar Mc Conkey, CLED o sangre de la marca OXOID, utilizando las pruebas bioquímicas tales como producción de pigmento, observación de hemólisis en agar sangre, prueba de la oxidasa, Kligler, citrato, crecimiento a 42°C, susceptibilidad a la polimixina B, licuefacción de la gelatina y medios de oxidación-fermentación.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó en agar Mueller Hinton a través del método de difusión en disco descrito por Kirby-Bauer⁽⁷⁾, de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M100- S24, vol. 34, N° 1, 2014⁽⁸⁾. Se emplearon los siguientes discos de antibióticos: imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, doripenem 10 µg, ceftazidima 30 µg, cefepime 30 µg (Oxoid) y amoxicilina/ ácido clavulánico 20/10 µg (BBL).

La detección fenotípica de metalobetalactamasas se realizó inoculando una placa de agar Müeller-Hinton con una suspensión 0,5 Mc Farland de la cepa a estudiar. Se colocó el disco de EDTA/SMA 750/300 µg (ácido etilendiaminotetraacético/ácido tioglicólico) a 20 mm de distancia de los discos de imipenem, meropenem y doripenem. En los aislados productores de MBLs se observará efecto sinérgico (ampliación del halo de inhibición) entre los discos de carbapenémicos y el disco de EDTA/SMA ^(9,10).

Para el control de calidad de las pruebas bioquímicas y de susceptibilidad se empleó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, según criterios del CLSI ⁽⁸⁾.

RESULTADOS

De acuerdo al perfil de susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos se obtuvo para el imipenem un 58,96% de sensibilidad, 16,82% de sensibilidad intermedia y 24,21% de resistencia; para meropenem un 64,21% de sensibilidad, 10,52% de sensibilidad intermedia y un 25,26% de resistencia y para Doripenem un 69,47% de sensibilidad, 5,26% de sensibilidad intermedia y 25,26% de resistencia.

Así mismo, el perfil de susceptibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* a los otros dos antibióticos betalactámicos ensayados: ceftazidima presento un 73,68% de sensibilidad, 11,57% de sensibilidad intermedia y 14,73% de resistencia, cefepime un 80% de sensibilidad, 12,63% de sensibilidad intermedia y un 7,36% resistencia.

En cuanto a la detección de las cepas productoras de MBLs se obtuvieron 20 (30,76%) cepas positivas para el test, de las cuales 17 fueron detectadas solo con el disco de imipenem, 3 con los discos de imipenem y meropenem simultáneamente y ninguna fue detectada con el disco de doripenem. Además algunas de las cepas positivas para MBLs presentaban halos de inhibición para los carbapenémicos dentro de la categoría sensible (M100 S24) como se muestra en la tabla N°1.

Tabla N° 1. Detección de MBLs en *P. aeruginosa*

Antibiótico	N (%)	MBLs
DORIPENEM:		
Sensible	66 (66.47%)	10
Intermedio	5 (5.26%)	0
Resistente	24 (25.26)	10
IMIPENEM		
Sensible	56 (58.96%)	2
Intermedio	16 (16.82%)	14
Resistente	23 (24.21%)	4
MEROPENEM		
Sensible	61 (64.21%)	4
Intermedio	10 (10.52%)	6
Resistente	24 (25.26%)	10

DISCUSION

Las infecciones humanas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* suelen ser severas y difíciles de tratar, debido a que este germen puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica, constituyendo un problema desde el punto de vista clínico y epidemiológico ^(1,2,3). Los antibióticos betalactámicos principalmente los carbapenémicos, constituyen una opción terapéutica hacia este microorganismo debido a su poder bactericida, gran tolerabilidad, incluso en pacientes con insuficiencia renal y hepática, y la posibilidad de terapias combinadas ^(4,5).

La resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* se ha incrementado significativamente en los últimos años. Luján et al. ⁽¹¹⁾, reportaron en Lima, un porcentaje de resistencia en *P. aeruginosa* de 47% para meropenem y 27% para imipenem en el año 2008. Por su parte Riera et al. ⁽¹²⁾ reportaron en España para el período 2008-2009 un 33% de resistencia para meropenem y 35% para imipenem.

Para el periodo marzo 2013-2014 en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas de Caracas, se obtuvieron los siguientes porcentajes de sensibilidad disminuida (intermedios y resistentes) a los carbapenémicos en *P. aeruginosa*: 41,04 % a imipenem y 35.79 % a meropenem similar según datos KERMIC para el año 2013 con 61% a imipenem y 59% a meropenem, en dicho laboratorio, demostrando así la alta resistencia que estas cepas presentan a este grupo de antibióticos.

Los datos de susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos obtenidos en este estudio reflejan una actividad de doripenem similar a meropenem y superior a imipenem, con una sensibilidad según los puntos de corte establecidos por el CLSI 2014 de 66,47% para doripenem, 64,21% para meropenem y 58,96% para imipenem. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Pillar et al. ⁽¹³⁾, en un estudio donde determinaron la susceptibilidad a los carbapenémicos en 875 cepas de *P. aeruginosa*, aisladas en 44 hospitales de EE.UU durante el año 2005-2006, encontrando un porcentaje de sensibilidad de 88,3% para doripenem, 85,3% para meropenem y 76,3% para imipenem.

De igual manera, Nicola et al. ⁽¹⁾ en Argentina, evaluaron la actividad *in vitro* de doripenem, meropenem y imipenem frente a 93 aislamientos de *P. aeruginosa*, encontrando que doripenem fue más activo (97,3% sensibles) que el imipenem (55,9% sensibles) y al menos equiparable al meropenem (75,3% sensibles).

Por su parte, los resultados obtenidos en la presente investigación difieren con otros estudios, tal es el caso de Gimeno et al. ⁽¹⁴⁾, en el que analizaron la actividad de carbapenémicos en 448 aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos durante el estudio de vigilancia epidemiológica COMPACT en España, obteniendo una actividad equiparable en los carbapenémicos ensayados, con una sensibilidad de 66,9% para doripenem, 66,9% para meropenem y 64,7% para imipenem. La buena actividad de doripenem puede deberse a la afinidad por las PBP de *P. aeruginosa* ^(5,15).

En cuanto a la resistencia a los carbapenémicos ensayados, doripenem y meropenem presentaron un 25,26%, mientras que imipenem un 24,21%, solo se detectó la presencia de metalobetalactamasas en 30,76% de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes, lo que indica que éste no es el principal mecanismo de resistencia, pudiendo estar involucrados la presencia de bombas de expulsión o sistema de eflujo, disminución de permeabilidad de la pared celular por pérdida de porinas (OprD), sobreexpresión de AmpC ^(2,3,12,16,17). En el caso de doripenem y meropenem con resistencias equiparables, puede deberse a la llamada resistencia cruzada o co-resistencia también por sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM ⁽¹⁶⁾. Además el imipenem es el que mejor detectó la presencia de MBLs en este microorganismo con el método utilizado, por lo que debe incluirse siempre para evitar falsos negativos.

Doripenem muestra actividad *in vitro* comparable a meropenem y superior a imipenem frente a las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital Vargas de Caracas, en el periodo Marzo 2013 - Marzo 2014, por lo que podría presentarse como una alternativa en el tratamiento de Infecciones causadas por este microorganismo, con todas las ventajas que un betalactámico ofrece: gran poder bactericida y eficacia antibacteriana, capacidad reducida de selección de resistencias, gran tolerabilidad, incluso en pacientes con insuficiencia renal y hepática, y la posibilidad de terapias combinadas y de aumento de dosis para situaciones de mayor gravedad.

Se recomienda determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los carbapenémicos ensayados para determinar más efectivamente la actividad de los mismos frente a *P. aeruginosa* y además compararlas con el método de difusión en disco. Realizar pruebas de biología molecular a las cepas resistentes a doripenem para documentar cual es el mecanismo probable de esta resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Nicola F, García S, Arduino M, Di Chiara J, Smayevsky. Actividad comparativa *in vitro* de doripenem y de otros carbapenems frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Argent de Microbiol. 2010; 42(3): 1851-7617.
- 2.- Cejas M, Almuzara G, Santella A, Tuduri S, Palombarani S, Figueroa G, et al. Caracterizaciones fenotípicas y genotípicas de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. Rev Argent de Microbiol. 2008; 40: 238-245.
- 3.- Pagniez M, Radice A, Cuirolo O, Rodríguez H, Rodríguez C, Vay A, et al. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems en un Hospital Universitario de Buenos Aires. Rev Argent de Microbiol. 2006; 38(1):1851-7617.
- 4.- Suarez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos; Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge. Enf Infect Microbiol Clin. 2009; 27(2):116–129.
- 5.- Fresnadillo MJ, García MI, García E, García JE. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(Supl 2): 53-64.
- 6.- Food and Drug Administration (FDA). Drugs safety and availability. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm387971.htm>. (Consultado 05 de junio 2014)
- 7.- Torrico E, Trigoso C. Manual de procedimientos y control de calidad interno método de Bauer Kirby. Bolivia: Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica INLASA; 2003.
- 8.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100- S24. 2014; 34(1).
- 9.- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. Rev Microbiol Enf Infec. 2011; 29(7).
- 10.- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J Clin Microbiol. 2000; 38(1):40-43.

- 11.- Luján DA, Ibarra JO, Mamani E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev Biomed. 2008; 19:156-160.
- 12.-. Riera E, Cabot G, Mulet X, García M, Del Campo R, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenemes resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2022-2027. 2011.
13. - Pillar CM, Torres MK, Brown NP, Shah D, Sahm DF. *In vitro* activity of doripenem, a carbapenemes for the treatment of challenging infections caused by gram negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12).
- 14.- Gimeno C, Cantón R, García M, Gobernado y Grupo Español de Estudio de Doripenem. Actividad comparativa de doripenem, meropenem e imipenem en aislados recientes obtenidos durante el estudio de vigilancia epidemiológica COMPACT-España. Rev Esp Quimioter. 2010; 23(3):144-152.
15. - Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK. Affinity of doripenem and comparators to penicillin binding protens in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:1510-1512.
- 16.- Miyawaki K, Miwa Y, Seki M, Asari S, Tomono K, Kurokawa N. Correlation between the consumption of meropenem or doripenem and meropenem susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Japan. Biol Pharm Bull. 2012; 35(6): 946-949.
- 17.- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 1633-41.

Recibido: 28 de Julio de 2016

Aprobado: 27 de octubre de 2016