

# Die Wirkung von Desacetylcefotaxim, einem Metaboliten von Cefotaxim, in vitro und auf die experimentelle Infektion mit *Escherichia coli*

J. WIRBELAUER<sup>1</sup>, H. HOF<sup>1</sup>, J. HACKER<sup>2</sup>

Universität Würzburg,

<sup>1</sup> Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Josef-Schneider-Straße 2,

<sup>2</sup> Institut für Genetik und Mikrobiologie, Röntgenring 11,  
D-8700 Würzburg

Die MHK-Werte von Desacetylcefotaxim gegen verschiedene, z. T. ampicillinresistente Stämme von *Escherichia coli*, die mit Hilfe einer Agardilutionsmethode erhoben wurden, waren höher als die von Cefotaxim und Ceftriaxon, jedoch niedriger als die von Cefoxitin. In einem Modell der systemischen Infektion der Maus mit einem plasmidtragenden, betalactamaseproduzierenden Stamm von *E. coli* führte die Therapie mit Desacetylcefotaxim zu einer starken Reduktion der Keime pro Leber. Im Vergleich zur Therapie mit Cefotaxim trat die protektive Wirkung aber verlangsamt ein. Desacetylcefotaxim ist also kein unnützes Abbauprodukt von Cefotaxim.

\* \* \*

## Activity of Desacetylcefotaxime, a Metabolite of Cefotaxime, In Vitro and in a Model of Experimental Infection with *Escherichia coli*

The MIC values of desacetylcefotaxime, as determined by an agar dilution method, for several strains of *Escherichia coli* largely resistant to ampicillin were considerably higher than those of cefotaxime or ceftriaxone respectively. The values were, however, definitely lower than those of cefoxitin. In a mouse model of a systemic infection with a plasmid-bearing,  $\beta$ -lactamase producing strain of *E. coli* the therapeutic potency of ampicillin, cefotaxime and desacetylcefotaxime was determined by counting the bacterial numbers per liver at days 1, 3 and 7 after subcutaneous infection with about  $10^3$  viable bacteria. Desacetylcefotaxime was able to reduce the bacterial load considerably, though with a delay in comparison to cefotaxime.

Durch seine hohe Betalactamastabilität entwickelt Cefotaxim eine sehr gute antibakterielle Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum vor allem gramnegativer Bakterien (2, 7, 11). Im Wirtsorganismus wird dieses Antibiotikum zu einem – allerdings geringen – Anteil abgebaut. Der Hauptmetabolit ist dabei das Desacetylcefotaxim (1, 9), das noch einen intakten Betalactamring enthält. Obwohl dieses Derivat nicht mehr so gut wie Cefotaxim selbst wirkt, besitzt es dennoch eine beachtliche antibakterielle Wirkung, die sich z. B. mit der anderer Cephalosporine, z. B. Cefazolin und Cefoxitin, messen kann (6, 8, 13).

An einem Mausmodell einer systemischen Infektion mit *Escherichia coli* (3) wurde die In-vivo-Aktivität dieses Metaboliten mit derjenigen der Muttersubstanz verglichen.

## Material und Methodik

*Substanzen:* Reinsubstanz von Cefotaxim (Claforan<sup>®</sup>) und von Desacetylcefotaxim wurde freundlicherweise von Herrn Dr. BRUCH (HOECHST, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Als

**Tabelle 1:** In-vitro-Empfindlichkeit gegen Cefotaxim, Desacetylcefotaxim und Kontrollsubstanzen anhand der Agardilutionsmethode

	MHK-Werte (mg/l)				
	Cefotaxim	Desacetyl- cefotaxim	Ampicillin	Cefoxitin	Ceftriaxon
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	0,5	4	0,125	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	>128	>128	>128	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	≤0,03	0,5	4	2	≤0,03
ATCC 25922 pBR322 (Betalactamase)	≤0,03	0,25	>128	2	≤0,03
U 6333	0,06	0,5	>128	4	≤0,03
U 6454	0,06	0,5	>128	8	0,06
U 6544	≤0,03	0,25	>128	1	≤0,03
U 6549	≤0,03	0,25	>128	4	≤0,03
U 6762	≤0,03	0,25	>128	2	≤0,03
U 6773	≤0,03	0,25	>128	4	≤0,03
U 6776	≤0,03	0,5	>128	2	≤0,03
U 6787	0,06	0,5	>128	2	≤0,03
U 6819	≤0,03	0,25	>128	4	≤0,03
U 7249	≤0,03	0,5	>128	4	≤0,03
U 9544	≤0,03	0,125	>128	2	≤0,03
<i>Citrobacter freundii</i> U 8494	0,25	2	64	128	0,25

Kontrollen wurden Ampicillin (Amblosin<sup>®</sup>, HOECHST), Cefoxitin (Mefoxitin<sup>®</sup>, MSD, München) und Ceftriaxon (Rocephin<sup>®</sup>, HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach-Wyhlen) mitgeführt.

**Bakterien:** Die Stämme *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 und *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 wurden als Kontrollen mitgeführt. Der Stamm *E. coli* ATCC 25922 wurde durch Transformation mit dem Plasmid pBR322 beladen, das eine Betalactamase vom Typ TEM-2 kodiert (5). Dieser plasmidtragende Stamm wurde jeweils in Kulturmedien angezüchtet, denen 100 mg/l Ampicillin zugesetzt waren.

Daneben wurden *E. coli*-Stämme aus dem Urin von Patienten mit akuter Pyelonephritis getestet, die wegen ihrer Resistenz gegen Ampicillin im Routinelabor aufgefallen waren. Die Stämme wurden auf MACCONKEY-Agar-Platten bei 4° C aufbewahrt. Für die Testung in vitro bzw. in vivo wurden sie in MUELLER-HINTON-Bouillon überimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet.

**Testung der Empfindlichkeit in vitro:** Die minimalen Hemmkonzentrationen wurden mit der Agardilutionsmethode bestimmt (12), wobei MUELLER-HINTON-Agar als Nährsubstrat verwendet wurde.

**Testung der Wirksamkeit in vivo:** Weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht von ca. 25 g wurden in SPF-Zustand vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde (Hannover) bezogen.

Eine Suspension von ca. 10<sup>3</sup> Keimen von *E. coli* ATCC 25922 (pBR322) in 0,3 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurde mit 0,5 ml flüssigem 1,5%igem Tryptoseagar (45° C) vermischt und unmittelbar danach einer Maus subkutan (am Rücken) injiziert (3). Während eine Gruppe von Mäusen unbehandelt blieb, wurden andere mit Antibiotika behandelt. Ab sechs Stunden nach der Infektion erhielt jedes Tier an drei aufeinanderfolgenden Tagen zweimal pro Tag (morgens und abends) je 0,5 mg einer Substanz, gelöst in 0,2 ml H<sub>2</sub>O, intraperitoneal injiziert. An den Tagen 1, 3 und 7 nach Infektion wurden jeweils fünf Tiere aus einer Gruppe getötet. Die Keimzahl pro Leber wurde durch Ausplattieren bestimmt, einmal ohne und einmal mit Zusatz von 100 mg/l Ampicillin zum Nähragar.

## Ergebnisse

### In-vitro-Empfindlichkeit (Tab. 1)

Der Referenzstamm ATCC 25922 von *E. coli* ist nur mäßig empfindlich gegenüber Ampicillin, dagegen hochgradig gegenüber Cefotaxim und Ceftriaxon. Desacetylcefotaxim ist zwar deutlich weniger wirksam,

übertrifft aber immerhin noch Cefoxitin und Ampicillin.

Der plasmidtragende, betalactamaseproduzierende Stamm von *E. coli* ATCC 25922 (pBR322) ist zwar resistent gegenüber Ampicillin, aber unverändert empfindlich gegenüber den Cephalosporinen, eingeschlossen Desacetylcefotaxim. Das gleiche gilt auch für die ampicillinresistenten *E.-coli*-Stämme aus dem Routine-labor. Der Stamm *P. aeruginosa* ATCC 27853 ist nur mäßig empfindlich gegenüber Cefotaxim bzw. Ceftriaxon, aber völlig resistent gegenüber den anderen geprüften Substanzen. Ampicillin wirkt am besten gegen den Stamm *S. aureus* ATCC 25293, während die Cephalosporine deutlich schlechter wirksam sind. Desacetylcefotaxim ist wiederum etwa um den Faktor 8 weniger wirksam als Cefotaxim.

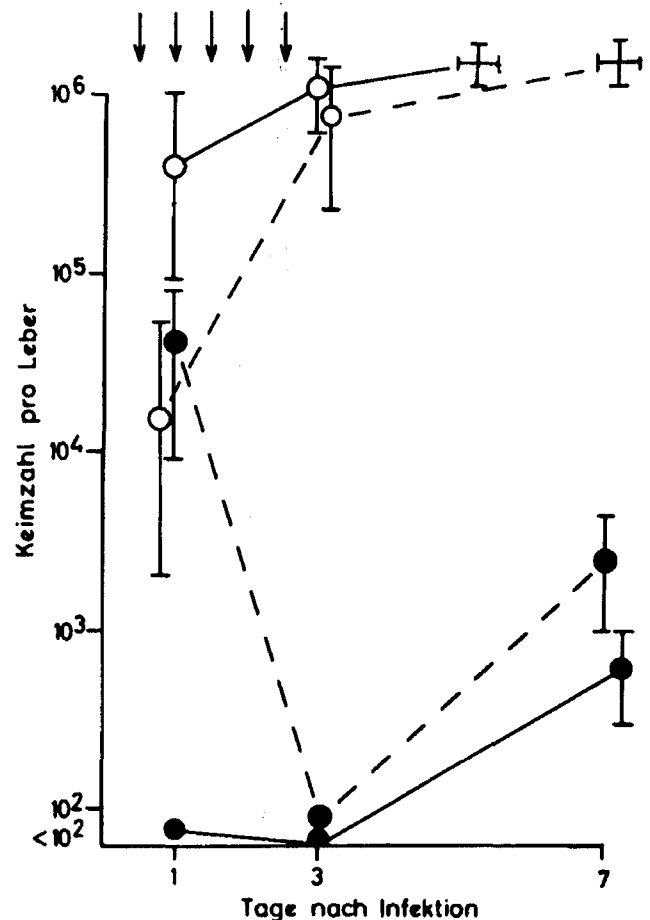
### In-vivo-Wirksamkeit (Abb. 1)

In unbehandelten Kontrolltieren vermehrt sich der plasmidtragende Stamm von *E. coli* ATCC 25922 (pBR322) so rasch, daß die Tiere ausnahmslos innerhalb von fünf Tagen sterben. Die Therapie mit Ampicillin verhindert zwar in den meisten Fällen einen frühzeitigen Tod, doch kommt es unter dieser Therapie zu einer starken Vermehrung der Erreger und die Tiere sterben nach sieben Tagen. (Offensichtlich wird das Plasmid pBR322 auch in vivo stabil in den Bakterien repliziert, denn die Keimzahlen pro Leber sind bei Zusatz von Ampicillin zum Kulturmedium gleich hoch wie bei den Kontrollplatten ohne Ampicillinzusatz.) Cefotaxim hat eine durchschlagende therapeutische Wirkung. Von Beginn der Therapie an verschwinden die Bakterien aus der Leber.

Auch Desacetylcefotaxim hat noch eine starke protektive Wirkung, die allerdings erst mit Verzögerung eintritt.

### Diskussion

Die Cephalosporine der 3. Generation, zu denen Cefotaxim und Ceftriaxon zu zählen sind, zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegen Betalactamasen aus, die den Betalactamring der Antibiotika aufspalten, wodurch die Substanz ihre antibakterielle Aktivität verliert. Eine Besonderheit des Cefotaxims besteht darin, daß diese Substanz durch unspezifische Esterasen des Wirtsorganismus verändert werden kann (2). Der



**Abbildung 1:** Die Infektion von Kontrollmäusen (—○—), die mit  $10^3$  *E. coli* ATCC 25922 (pBR322) subkutan infiziert worden waren, wurde durch Bestimmung der Keimzahlen pro Leber quantitativ erfaßt. Andere infizierte Mäuse wurden mehrmals mit 0,5 mg (↓) Ampicillin (--○--), Cefotaxim (—●—) bzw. Desacetylcefotaxim (--●--) behandelt. Pro Gruppe wurden fünf Tiere untersucht. Die Mittelwerte und die mittleren Fehler sind angegeben

Hauptmetabolit ist dabei das Desacetylcefotaxim, das andere pharmakologische (10) wie auch antibakterielle (4, 6, 8) Eigenschaften hat als die Muttersubstanz.

Die veränderten antibakteriellen Eigenschaften bestehen zum einen darin, daß die MHK-Werte deutlich höher liegen als bei Cefotaxim bzw. Ceftriaxon, jedoch niedriger als bei anderen Cephalosporinen (Tab. 1) (6, 8, 13). Zum zweiten ist die Stabilität dieses Derivats gegenüber manchen Klassen von Betalactamasen im Vergleich zu Cefotaxim erhöht (6). Auch gegen ampicillinresistente *E.-coli*-Stämme aus dem Urin von Pyelonephritis-Patienten ist diese Substanz immer noch recht gut wirksam (Tab. 1).

Auch in vivo zeigt der Hauptmetabolit von Cefotaxim eine recht gute therapeutische Wirkung gegen die

Infektion mit einem Stamm von *E. coli*, der das Multi-copy-Plasmid pBR322 trägt. Dieses kodiert eine Beta-lactamase vom Typ TEM-2, die weder Cefotaxim noch Desacetylcefotaxim spalten kann (6). Eine tödlich verlaufende Infektion von Mäusen, die mit einer niedrigen Keimzahl subkutan infiziert worden sind (3), kann nahezu ausschließlich durch diesen Metaboliten kuriert werden (Abb. 1). Desacetylcefotaxim ist also nicht ein unwirksames Abbauprodukt, sondern ein durchaus bedeutungsvoller Faktor bei der therapeutischen Wirkung von Cefotaxim. Dessen Wirksamkeit (Abb. 1) wie auch diejenige von Ceftriaxon (3) wird allerdings nicht ganz erreicht.

Wenn man zusätzlich noch bedenkt, daß durch einen synergistischen Effekt die Wirkung von Cefotaxim sogar noch verstärkt werden kann (4, 6, 8), so wird deutlich, daß mit dem Abbau eines Teils der Grundsubstanz in vivo kein wesentlicher Verlust der therapeutischen Wirksamkeit von Cefotaxim verbunden ist.

## Literatur

1. Chamberlain, J., J. D. Coombs, J. M. Fromson, R. J. Ings, C. M. MacDonald, J. McEwen. 1980. Metabolism of Cefotaxime in Animals and Man. *J. Antimicrob. Chemother.* 6, Suppl. A: 69-78.
2. Fu, K. P., P. Aswapokee, I. Ho, C. Matthijssen, H. C. Neu. 1979. Pharmacokinetics of Cefotaxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 592-597.
3. Hof, H., A. Christen, J. Hacker. 1986. Comparative Therapeutic Activities of Ciprofloxacin, Amoxicillin, Ceftriaxone and Co-Trimoxazole in a New Model of Experimental Infection with *Escherichia coli*. *Infection* 14: 190-194.
4. Jones, R. H., A. L. Barry, C. Thornsberry. 1982. Antimicrobial Activity of Desacetyl-Cefotaxime Alone and in Combination with Cefotaxime: Evidence of Synergy. *Rev. Infec. Dis.* 4, Suppl.: 366-373.
5. Lederberg, E. M., S. N. Cohen. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.* 119: 1072-1074.
6. Limbert, M., G. Seibert, E. Schrunner. 1982. The Cooperation of Cefotaxime and Desacetyl-Cefotaxime with Respect to Antibacterial Activity and  $\beta$ -Lactamase Stability. *Infection* 10: 97-100.
7. Neu, H. C., N. Aswapokee, P. Aswapokee, K. P. Fu. 1979. HR 756, a New Cephalosporine Active against Gram-Positive and Gram-Negative Aerobic and Anaerobic Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 273-281.
8. Neu, H. C. 1982. Antibacterial Activity of Desacetylcefotaxime Alone and in Combination with Cefotaxime. *Rev. Infec. Dis.* 4, Suppl.: 374-378.
9. Reeves, D. S., L. O. White, H. A. Holt, D. Bahari, M. J. Bywater, R. P. Bax. 1980. Human Metabolism of Cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.* 6, Suppl. A: 93-111.
10. Rupprecht, H., F. Kees, H.-P. Hümmer, H. Grobecker. 1986. Perioperative Antibiotikaprophylaxe bei Brustwandrekonstruktionen: Bestimmung von Cefotaxim im Serum, Knorpel- und Knochengewebe. *ZAC Zeitschr. antimikr. antineoplast. Chemother.* 4/4: 109-115.
11. Schrunner, E., M. Limbert, L. Penasse, A. Lutz. 1980. Antibacterial Activity of Cefotaxime and Other Newer Cephalosporins (In Vitro and In Vivo). *J. Antimicrob. Chemother.* 6, Suppl. A: 25-30.
12. Washington, J. A. 1985. Susceptibility Tests: Agar Dilution. Pp. 967-971. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, H. J. Shadomy (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 4th Edition. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C.
13. Wise, R., P. J. Wills, J. M. Andrews, K. A. Bedford. 1980. Activity of the Cefotaxime (HR 756) Desacetyl Metabolite Compared with those of Cefotaxime and Other Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 84-86.