

AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS CONTRA ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa*

Victória Caroline da Silva Amaral¹, Monica de Souza Ferreira de Mattos¹, Bruna Letícia dos Santos Vinha¹, Marcos Vinícios Cardoso¹, Nathalie Kira Tamura², Sheila Alexandra Belini Nishiyama¹, Maria Cristina Bronharo Tognim¹ (orientador)
email: mcbtognim@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Básicas da Saúde/Maringá¹,
Hospital Universitário Regional de Maringá PR²

Medicina, Clínica Médica, Doenças Infecciosas e Parasitárias

Palavras-chave: meropenem; polimixina B; resistência microbiana.

RESUMO

Este estudo visou avaliar a eficácia dos antibacterianos polimixina B (PMB) e meropenem (MEM), isoladamente e em combinação, contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* (CRAB) e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (Pa-MDR), que são conhecidas por dificultar a terapia antimicrobiana e aumentar os custos hospitalares. Quatro cepas de CRAB e duas de Pa-MDR, previamente classificadas em diferentes grupos moleculares, foram selecionadas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição em caldo, enquanto a curva de morte (*Time-Kill Curve*) avaliou a combinação dos antibacterianos PMB a 2 mg/L e MEM a 4 mg/L. Todas as cepas demonstraram resistência a ambos os antibacterianos, especialmente aos carbapenêmicos. Entre as quatro cepas de CRAB testadas, nenhuma mostrou efeito sinérgico na combinação dos antibacterianos em relação aos agentes individuais mais eficazes. Em um dos CRABs, a combinação foi antagonista, já que a PMB isolada foi mais eficaz. Por outro lado, uma das cepas de Pa-MDR apresentou sinergismo entre PMB e MEM, em comparação com PMB isolada. Notavelmente, o MEM isolado não foi eficaz contra as cepas de Pa-MDR. Com base nesses achados, sugere-se que estudos futuros considerem diferentes concentrações dos antibacterianos para elucidar se existem sinergismos, buscando aperfeiçoar as chances de sucesso terapêutico. Essa investigação é relevante para determinar se a combinação desses importantes antibacterianos pode ser aplicada na prática clínica médica, em resposta às desafiadoras infecções causadas por CRAB e Pa-MDR.

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (Pa-MDR) representam um problema de saúde pública, dificultando a terapia antimicrobiana e elevando o custo hospitalar. Entre os novos antibacterianos utilizados no mundo, Cefiderocol é o único fármaco ativo contra CRAB, contudo, não é utilizado em hospitais públicos do Brasil, em decorrência de seu alto custo. Para Pa-MDR associações de fármacos com inibidores de betalactamases tem sido promissoras, porém além do alto custo são

ineficazes contra Pa-MDR que possuem enzimas como as metalo-betalactamases (Tamma *et al.*, 2023). Nesse contexto, a associação de antimicrobianos tem sido uma alternativa terapêutica para infecções causadas por tais bactérias. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade *in vitro* dos antibacterianos polimixina B (PMB) e meropenem (MEM) puros e combinados contra isolados de CRAB e Pa-MDR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 4 isolados de CRAB e 2 de Pa-MDR recuperados de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá para a realização dos testes. Tais isolados foram previamente caracterizados como pertencentes a diferentes clusters de acordo com os dados obtidos pela tipagem molecular pelo método de *Enterobacterial repetitive intergenic consensus – polymerase chain reaction-ERIC-PCR* pelo Laboratório de Microbiologia Médica. A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os isolados foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme *Clinical Laboratory Standards Institute*. Para avaliação da combinação dos fármacos PMB 2 µg/mL e MEM 4 µg/mL foi utilizada a metodologia de curva de morte (*Time-Kill Curve-TKC*) conforme *Elipoulos; Moellering, 1991*.

Os antimicrobianos puros e combinados foram colocados em tubos contendo inóculo bacteriano de 10^5 - 10^7 UFC/mL em caldo *Mueller Hinton Broth* com cátions ajustados. Alíquotas das suspensões bacterianas foram retiradas nos tempos zero, 6 horas, 12h e 24h de exposição dos isolados aos diferentes fármacos puros ou em associação e, então foram diluídas, semeadas em placa e, incubadas a 35-37 °C em ar ambiente por 24hr. Após este tempo eram determinadas as contagens de colônias e realizado o cálculo para e UFC/mL de cada tempo. Os testes foram feitos por duas vezes em duplicata e as médias dos resultados determinadas e convertidas em \log_{10} . Por fim, os resultados foram plotados no *software Excel* em gráfico da contagem de UFC/mL em \log_{10} pelo tempo. O sinergismo foi considerado positivo quando houve uma redução de $\geq 2\log_{10}$ de UFC/mL entre o fármaco mais ativo e a associação dos fármacos.

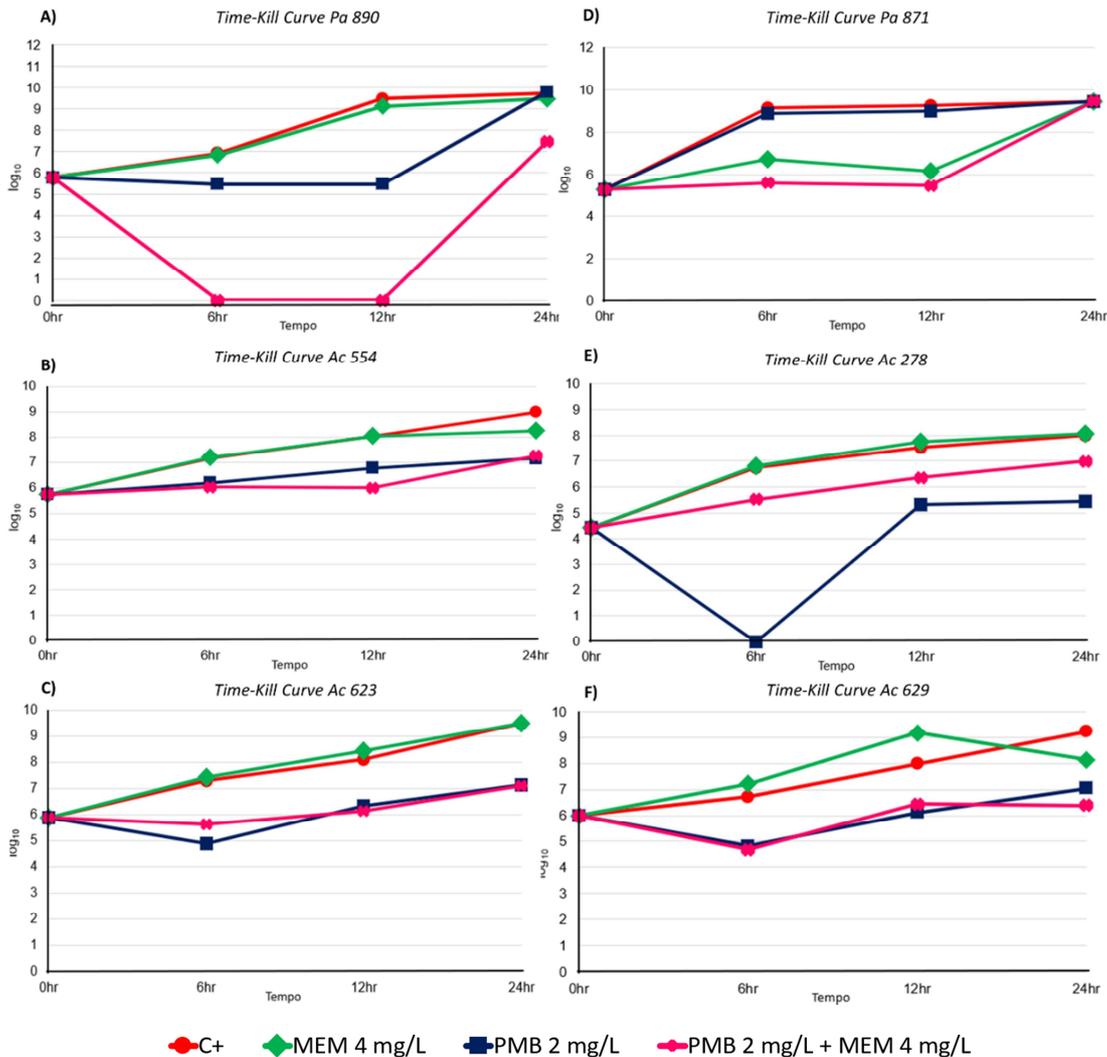
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM para MEM foi ≥ 16 mg/L para todos isolados e para PMB foi de 4, 8, 32 e ≥ 64 mg/L para os 4 isolados de CRAB selecionados e, 8 mg/L para os de Pa-MDR.

Entre as 4 amostras de CRAB testadas na TKC, em nenhuma verificou-se efeito sinérgico quando comparado a combinação antimicrobiana (de 2mg/L-PMB + 4mg/L-MEM) aos antibacterianos puros mais efetivos. Na combinação dos fármacos verificou-se apenas um atraso no crescimento em relação ao MEM puro (Figura 1.b, 1.c, 1.f).

Entre as amostras de Pa-MDR, foi observado que MEM puro não apresentou efetividade em nenhuma das amostras de Pa-MDR testadas, o que permitiu crescimento contínuo das bactérias. A amostra Pa 871 com PMB puro no período de 12h apresentou decaimento, voltando a crescer com 24h de incubação (Figura 1.b). Para a amostra Pa 890 a PMB puro apresentou mais efetividade em relação ao MEM puro nos tempos 6hr e 12hr (Figura 1.a). Em contrapartida, para a amostra Pa 871 o inverso foi observado, com maior crescimento em PMB do que em MEM. A

combinação dos antimicrobianos MEM e PMB na amostra Pa 890 no período de 6 horas apresentou decaimento de $\geq 2\log_{10}$ de UFC/mL, ou seja, sinergismo, em relação ao antibiótico mais efetivo (PMB). Nas horas seguintes, 12h e 24h a Pa 890 apresentou crescimento significativo na combinação, porém mantendo o decaimento $\geq 2\log_{10}$ de UFC/mL, já que a combinação tinha \log_7 e o puro \log_9 . Para Pa 871 não houve efeito sinérgico da combinação de antimicrobianos, já que após 24h a combinação obteve o mesmo resultado que o antibiótico puro mais efetivo (MEM), portanto, indiferente (Figura 1.a).



C+: controle positivo; MEM: meropenem; PMB: polimixina B

Figura 1 - Time-Kill Curve dos isolados bacterianos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

Atualmente, a incidência de CRAB e Pa-MDR multirresistentes, associados a graves infecções e altas taxas de morbimortalidade, tem aumentado no mundo todo, levando a necessidade de desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos e antibacterianos (Tamma PD *et al.*, 2023). Por isso, maiores estudos de sinergismo envolvendo diferentes doses de fármacos, são necessários para obter maior chance

de sucesso terapêutico. Nesse contexto, estudos avaliando a possibilidade de sinergismo entre antimicrobianos contra bactérias multiressistentes têm sido relatados (Ribeiro *et al.*, 2023). Exemplo, a avaliação da efetividade da combinação de polimixina-carbapenênicos contra isolados de CRAB realizada por Soudeiha *et al.*, sendo a polimixina E (colistina) avaliada pelo grupo. Diferentemente de nossos resultados, o estudo registrou efeito aditivo da combinação de colistina-meropenem para os isolados testados (Soudeiha *et al.*, 2017).

Nossos isolados possuíam resistência a ambos antimicrobianos e com CIM elevadas principalmente para os carbapenêmicos. Em doses terapêuticas a concentração de MEM administrados 2g ao dia pode atingir picos de 40mg/L e nós testamos 4mg/L o que seria o vale sérico; da mesma forma as concentrações terapêuticas de PMB pode atingir 20mg/L e foi testado apenas 2ml/L. Acreditamos que doses mais elevadas deverão ser testadas para que possamos comprovar se realmente não existe efeito sinérgico entre estes fármacos e assim buscar otimizar as chances de sucesso terapêutico.

CONCLUSÕES

Com base nessas informações, é prudente conduzir estudos adicionais, abrangendo diversas concentrações desses fármacos. Essa abordagem é essencial para estabelecer de maneira conclusiva a existência de possíveis sinergismos entre esses dois agentes farmacológicos significativos, com potencial aplicação no campo da prática clínica médica.

AGRADECIMENTOS

A fundação araucária pelo apoio financeiro no projeto.

REFERÊNCIAS

ELIOPULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In "Antibiotics in Laboratory Medicine" 3rd edition, ed. Lorian, V. 1991.

RIBEIRO, Aghata Cardoso da Silva *et al.* In Vitro and In Vivo Synergism of Fosfomycin in Combination with Meropenem or Polymyxin B against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 237, 2023.

SOUDEIHA, Micheline AH *et al.* In vitro evaluation of the colistin-carbapenem combination in clinical isolates of *A. baumannii* using the checkerboard, Etest, and time-kill curve techniques. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 209, 2017.

TAMMA, P. D; *et al.* Infectious Diseases Society of America antimicrobial resistant treatment guidance: gram-negative bacterial infections. **Infectious Diseases Society of America**. 2023.