

TESTE DE CURVA DE MORTE MODIFICADO PARA DETECÇÃO DE SINERGISMO ANTIMICROBIANO EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE *bla*_{KPC}

Marcos Vinícios Cardoso (PIBIC/ UEM)¹, Jânio Leal Borges Alvest[†], Heloisa Moreira Dias Pereira¹, Fabrícia Gimenes¹, Cecília Saori Mitsugui², Maria Cristina Bronharo Tognim¹ (Orientador). E-mail: mcbtognim@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR¹; Hospital Universitário Regional de Maringá²; [†]*in memoriam*

Microbiologia; Microbiologia aplicada; Microbiologia Médica.

Palavras-chave: KPC, sinergismo, *time-kill curve*.

RESUMO

O tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) é um desafio em hospitais no mundo todo, principalmente após a pandemia da COVID-19. Tratamentos eficazes são limitados, assim novas alternativas têm sido buscadas. A combinação de antibióticos surgiu como opção promissora. Métodos como a *curva de morte* (*time-kill curve*-TKC) avaliam a possibilidade de sinergismo entre os antibacterianos, porém metodologias mais ágeis são necessárias. Este estudo teve como objetivo propor uma modificação no método de curva de morte para avaliar a atividade da polimixina B combinada com meropenem em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-2. Cinco isolados de *K. pneumoniae* positivos para o gene *bla*_{KPC-2} foram avaliados pela TKC e curva de morte modificada (*time-kill curve* modified-TKCM). O sinergismo foi obtido para 3 amostras em ambos os testes. Resultados mostraram 100% de concordância entre os resultados da TKC e TKCM. Inclusive, observou-se que até mesmo com 12h de incubação, detectou-se sinergismo na TKCM, enquanto na TKC o mesmo foi visto com 24h, sugerindo que às 12 horas podem antecipar um possível resultado, dispensando um período maior para a detecção do sinergismo. Conclui-se que o TKCM é ágil e sensível na detecção de sinergismo, podendo ser viável para aplicação em rotinas laboratoriais na detecção de possíveis atividades sinérgicas entre antimicrobianos para maior segurança no tratamento de bactérias multirresistentes.

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) são um grande problema de saúde pública, elevando a mortalidade dos pacientes e os custos hospitalares (Albieiro, J, *et al.*, 2016). Até mesmo para ceftazidima-avibactam e meropenem-vaporbactam, novos fármacos desenvolvidos com espectro de ação contra bactérias produtoras de KPC, nem sempre o tratamento é efetivo (Tamma PD *et al.*, 2023). Ainda, existem limitadas opções terapêuticas disponíveis, que muitas vezes são baseadas em polimixinas

(polimixina B e colistina), para os quais isolados resistentes já foram registrados (Albieiro, J, *et al.*, 2016).

Nesse contexto, estudos avaliando novas opções terapêuticas são necessários. A terapia combinada tem se mostrado uma alternativa eficaz, minimizando o surgimento de resistência (Tamma PD *et al.*, 2023). O método curva de morte (*time-kill curve-TKC*) já foi utilizado para avaliar o sinergismo, contudo, trata-se de uma metodologia complexa, sendo difícil sua aplicabilidade em rotinas laboratoriais (Sharma, R., 2017; Ribeiro, ACDS, *et al.*, 2023). Por isso, este estudo propõe uma modificação no método de TKC para avaliar a atividade da polimixina B (PMB) combinada com meropenem (MEM) em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-2. O estudo busca alternativas viáveis para a rotina laboratorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cinco cepas de *Klebsiella pneumoniae* positivas para o gene *bla_{KPC-2}*, foram selecionadas e previamente diferenciadas por meio da técnica de tipagem *multilocus sequence typing* (MLST) no laboratório ALERTA da Universidade Federal de São Paulo. A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, usando caldo *Mueller Hinton Broth* com cátions ajustados (MHB-CA), seguindo os documentos do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Na metodologia TKC tubos contendo 10 mL de MHB-CA, com os antimicrobianos PMB e MEM, puros ou combinados, em concentração de 1/2 MIC foram utilizados. Em todos os tubos foi acrescentado inóculo bacteriano com aproximadamente 6×10^5 UFC/mL, sendo estes incubados a 35°C. Nos intervalos de tempo 0, 6, 12 e 24 horas, alíquotas de 100 µL foram retiradas dos tubos de teste e, após diluições seriadas, 25 µL foram duplicadamente aplicados por meio do método da gota em meio *Mueller-Hinton Agar* (MHA). Estas placas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas, seguidas por contagem das colônias bacterianas. O critério para atividade sinérgica foi adotado conforme Pillai *et al.*, 2005.

No método TKCM, foram empregados discos dos antibióticos PMB e MEM (OXOID-Reino Unido) inseridos em tubos contendo MHB e agitados em vortex para homogeneização. A concentração do antibiótico foi determinada pela quantidade indicada no disco. O número de discos e as diluições foram ajustados de acordo com cada isolado para alcançar uma concentração de 1/2 MIC.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para mediar a relação linear entre escalas logarítmicas nas contagens de 6, 12 e 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de *K. pneumoniae* selecionadas pertenciam a ST diferentes, de acordo com a diferenciação realizada pelo método MLST. Os isolados foram recuperados de João Pessoa, São Paulo, Recife e Campo Grande. Entre as cinco amostras de *K. pneumoniae*, a CIM para MEM foi 1 µg/mL (sensível) para duas amostras, embora todas fossem produtoras de carbapenemase KPC-2, enquanto para as outras três foi de 16, 256 e 32 µg/mL, sendo todas resistentes ao fármaco. Para PMB, apenas uma amostra apresentou resistência com CIM 32 µg/mL, sendo a CIM das demais amostras 1 µg/mL. A CIM de 32 µg/mL para PMB e MEM foi observada na mesma amostra (Tabela 1).

No método TKC, das 5 amostras, todas carreadoras do gene *bla*_{KPC-2}, foi detectado sinergismo na combinação de PMB+MEM em 3 amostras no tempo de 24h (Tabela 2). O método de TKCM corroborou com os resultados da TKC, mostrando 100% de concordância (Tabela 2) e uma taxa de atividade sinérgica de 75% (3/4) em PMB+MEM (Tabela 2). Uma amostra (Kp-40) não foi testada pelo método de TKCM, embora tenha sido testada por TKC. Para uma outra amostra (Kp-28) cujo resultado foi indiferente no tempo 24h pela TKC, na TKCM desde 12h foi observado sinergismo (Tabela 2).

Tabela 1. Caracterização de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase KPC-2 incluídas no estudo

Isolados	ST	Gene <i>bla</i> _{KPC-2}	MIC (µg/mL)		Centros médicos de isolamento
			PMB	MEM	
Kp-5	437	+	1	1	João Pessoa
Kp-9	133	+	1	16	São Paulo
Kp-28	617	+	1	1	São Paulo
Kp-40	11	+	1	256	Recife
Kp-46	17	+	32	32	Campo Grande

ST: *multilocus sequence typing*; CIM: concentração inibitória mínima; PMB: polimixina B; MEM: meropenem

Tabela 2. Resultados amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 pelos métodos de *Time Kill Curve* e *Time Kill Curve modified*

Isolados	TKC PMB+MEM	TKCM PMB+MEM			Coeficiente de Pearson	
	Varição de Log UFC/mL 24hr	Varição de Log UFC/mL 6hr	Varição de Log UFC/mL 12hr	Varição de Log UFC/mL 24hr		
Kp-5	0,6 (I)	-0,4 (I)	0,2 (I)	-0,2 (I)	6/12h	12/24h
Kp-9	7,6 (S)	0,0 (I)	4,9 (S)	4,9 (S)	0,88	0,95
Kp-28	-0,3 (I)	1,3 (I)	7,6 (S)	8,4 (S)		
Kp-40	2,4 (S)	NT	NT	NT		
Kp-46	5,8 (S)	-0,2 (I)	4,7 (S)	6,2 (S)		

MEM - meropenem; PMB- polimixina B; TKC –Curva de morte; TKCM –Curva de morte modificada; (I) – Indiferente; (S) – Sinergismo; NT - Não testada; UFC: Unidades formadoras de colônia

Pesquisas avaliando sinergismo de droga, pela metodologia de TKC, para tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase têm sido realizadas no mundo (Sharma, R., 2017; Ribeiro, ACDS, *et al.*, 2023). Exemplo é o estudo de Ribeiro *et al.* que recentemente sugeriu as combinações de fosfomicina+MEM e fosfomicina+PMB como alternativa de tratamento (Ribeiro, ACDS, *et al.*, 2023).

No estudo semelhante ao nosso, de Sharma e colaboradores, também foi registrado sinergismo entre as drogas MEM+PMB. Para eles, o sinergismo foi detectado em todas as concentrações desses antimicrobianos, nos isolados sensíveis a PMB e com CIM <16 (µg/mL) para MEM. Até mesmo para isolados com CIMs mais elevadas de MEM ou PMB. Na maioria dos nossos isolados, o sinergismo foi observado a partir de 12h de experimento, apesar de terem apresentado CIMs mais baixas para os antimicrobianos. Até mesmo para o isolado com CIM mais elevada (Kp-46) o sinergismo foi visto com 12h, inclusive nas duas metodologias. Isso nos

mostra que para uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2, a combinação de MEM+PMB é uma alternativa efetiva.

Ao interpretar o sinergismo no teste TKCM, notou-se que para combinação PMB+MEM os resultados obtidos em 12 horas eram idênticos aos obtidos em 24 horas. Assim, o método TKCM exibiu uma maior sensibilidade em detectar sinergismo quando a combinação de antimicrobianos era sinérgica no método TKC.

CONCLUSÕES

O método TKCM se mostrou sensível e rápido na detecção do sinergismo, sendo uma alternativa prática para laboratórios de rotina, pelo uso de materiais facilmente encontrados em laboratórios de microbiologia. Observou-se uma relação linear entre as escalas logarítmicas nas contagens de 12 e 24 horas, sugerindo que às 12 horas podem antecipar um possível resultado, dispensando um período maior para a detecção do sinergismo.

AGRADECIMENTOS

À UEM pelo apoio ao desenvolvimento científico.

REFERÊNCIAS

Pillai, S. K., Eliopolous, G. M., & Moellering, R. C. (2005). Antimicrobial combinations. In **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 5ª edição, (Ed. V. Lorian), pp. 366–425. Williams & Wilkins, Baltimore, MD

Ribeiro, A. C. D. S., Chikhani, Y. C. D. S. A., Valiatti, T. B., Valêncio, A., Kurihara, M. N. L., Santos, F. F., Minarini, L. A. D. R., & Gales, A. C. (2023). In Vitro and In Vivo Synergism of Fosfomicin in Combination with Meropenem or Polymyxin B against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. **Antibiotics (Basel)**, 12(2), 237. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020237>

Sharma, R., Patel, S., Abboud, C., Diep, J., Ly, N. S., Pogue, J. M., Kaye, K. S., Li, J., & Rao, G. G. (2017). Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 49(2), 224–232. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2016.10.025>

Tamma, P. D., et al. (2023). Infectious Diseases Society of America Antimicrobial-Resistant Treatment Guidance: Gram-Negative Bacterial Infections. **Infectious Diseases Society of America**. Disponível em: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/amr-guidance/>.

Campos, A. C., Albiero, J., Ecker, A. B., Kuroda, C. M., Meirelles, L. E. F., Polato, A., Tognim, M. C. B., Wingeter, M. A., & Teixeira, J. J. V. (2016). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K pneumoniae: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, 44(11), 1374–1380. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2016.03.022>