

ACINETOBACTER BAUMANNII EXTREMAMENTE RESISTENTE: SINERGISMO DE ANTIBACTERIANOS USADOS CLINICAMENTE

Ana Beatriz dos Santos (PIBIC/CNPq), Monica de Souza Ferreira de Mattos, Bruna Letícia dos Santos Vinha, Letícia de Andrade, Mirian Nicéa Zarpellon, Sheila Alexandra Belini Nishiyama (coorientadora), Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientadora). E-mail: mcbtognim@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.
Hospital Universitário Regional de Maringá PR.

Medicina/Clínica Médica/Doenças Infecciosas e Parasitárias

Palavras-chave: *Time Kill Curve.*, *Polimixina B.*, Sinergismo.

RESUMO

Acinetobacter baumannii (Ab) resistente aos carbapenêmicos (CRAB) e a Polimixina B (CRAB-PMB-R) é um grande desafio para saúde pública, devido à sua associação a infecções graves em pacientes críticos e à dificuldade no tratamento. O objetivo foi avaliar a ação da combinação de PMB e Meropenem (MEM) sobre CRAB-PMB-R. Foram selecionados cinco isolados de CRAB-PMB-R de *clusters* distintos (ERIC-PCR), previamente identificadas pelo sistema *Phoenix-BD™* e com concentração inibitória mínima de PMB realizada pelo *kit Policimbac-Probac*. Estes cinco CRAB-PMB-R foram submetidos à *Time kill curves* com associações de MEM e PMB em concentrações de pico baseadas em regimes terapêuticos intravenosos: MEM 2 g/dia (pico, 40,9 mg/L) e PMB 25,000 U/kg/dia (pico - 6.44 mg/L). Sinergismo positivo: redução de $\geq 2 \log_{10}$ de UFC/mL na combinação antimicrobiana em relação ao antibacteriano puro mais ativo. O experimento foi realizado em duplicata, calculando-se a média ao final. Foi observado sinergismo de PMB+MEM em todos os isolados. A droga pura mais efetiva foi a polimixina B, que demonstrou uma atividade superior em cerca de 4/5 dos isolados. O estudo demonstrou que o sinergismo é dependente da concentração dos antimicrobianos, pois apenas na concentração de pico sérico de MEM combinado com o pico sérico de PMB é que pôde ser verificado a morte de CRAB-PMB-R. Ressaltamos assim a necessidade de compreensão das propriedades farmacocinéticas das drogas, visto que o sinergismo poderá efetivamente ocorrer, pois somente em concentrações séricas adequadas poderemos ter sucesso terapêutico nas infecções por CRAB-PMB-R.

INTRODUÇÃO

A espécie bacteriana *Acinetobacter baumannii* possui um grande significado clínico devido a sua emergência como um patógeno nosocomial, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI), onde é responsável por altos níveis de mortalidade associados a suas infecções. Possui alta capacidade de adquirir e regular diversos mecanismos de resistência antimicrobiana, sendo classificado como

organismos multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug-resistant*), desafiando o sucesso terapêutico antimicrobiano atual (AYOUB, 2020)

As cepas de *A. baumannii* tem capacidade de sobrevivência prolongada em superfícies abióticas, fator que promove ampla disseminação, assim como para o agravamento clínico de pacientes internados em UTIs. A tendência terapêutica era o uso de carbapenêmicos, o que acarretou no surgimento de cepas resistentes ao mesmo, limitando o sucesso da terapia, e urgindo a necessidade de desenvolvimento de outras terapias antimicrobianas (LIU, 2024). *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB) é considerado prioridade nº1 na lista de patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) para pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, sendo inclusive considerado uma grande ameaça a saúde pública pelo centro de controle e prevenção de doenças (CDC). (MÜLLER, 2023).

Em decorrência de cepas MDR de *A. baumannii* a terapêutica ficou comprometida. A polimixina B (PMB) tornou-se uma das drogas de escolha, todavia a mesma possui altos níveis de toxicidade, além do aparecimento de resistência em algumas cepas, chamadas de XDR (do inglês, *Extensive drug resistant*). Portanto, a combinação de drogas para o sucesso terapêutico veio a ser uma alternativa (UPPALAPATI, 2020). Nesse sentido, o método *time kill curve* é a técnica que melhor apresenta consistência e confiabilidade de resultados, permitindo a combinação de dois ou mais antibióticos, para avaliação da sua atividade de acordo com o tempo e a concentração. (LORIAN, 2005)

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo realizar a *time kill curve* (TKC) para avaliar a ação da combinação de PMB e MEM em concentrações de pico sérico sobre *A. baumannii* extremamente resistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo utilizou o método TKC, onde foi analisado a atividade microbicida da combinação de dois antibióticos de classes diferentes, a polimixina B e o meropenem em concentrações de pico usadas na clínica médica.

Foram selecionadas 5 amostras de *A. baumannii* resistentes a PMB e resistentes aos carbapenêmicos de isolados apresentando diferenças de concentração inibitória mínima entre PMB e MEM e, perfis genéticos distintos, buscando maior variabilidade genética/heterogeneidade possível. A diferenciação genética foi realizada pela tipagem molecular *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR), utilizando o coeficiente de DICE $\leq 0,9$ para a diferenciação. Os isolados são provenientes de amostras do Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM) e pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

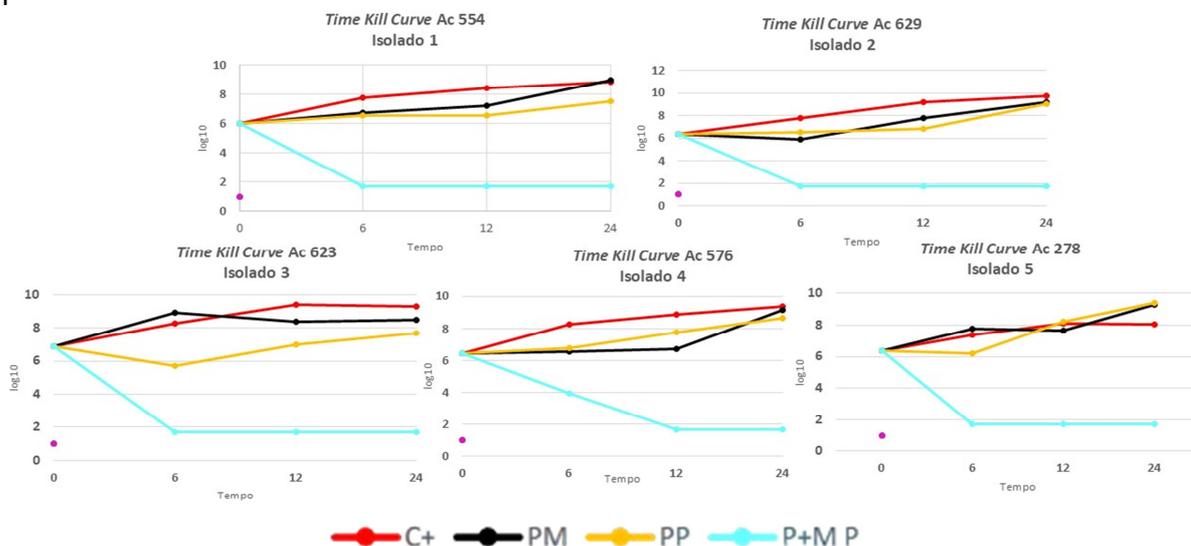
Para realização da TKC, concentrações de doses terapêuticas de pico de MEM e PMB baseadas na clínica para regimes intravenosos foram utilizadas: MEM 2 g/dia (pico, 40,9 mg/L) e PMB 25,000 U/kg/dia (pico - 6.44 mg/L). Tubos contendo 10^5 - 10^7 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de cada um desses isolados foram colocados em contato com os antimicrobianos puros e combinados na concentração de pico sérico, nos tempos de 6, 12 e 24 horas de exposição dos

isolados aos diferentes fármacos e suas combinações. Após a enumeração das UFC/mL em cada tempo, foram determinadas as médias e os resultados convertidos em \log_{10} plotados em gráficos, sendo considerado sinergismo na combinação antimicrobiana quando houve a redução de $\geq 2 \log_{10}$ em relação ao agente bacteriano puro mais ativo. O método TKC foi realizado em duplicata sendo feito a média dos dois experimentos e plotados em um gráfico, que em seguida foi analisado e discutido a cerca da existência ou não de sinergismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos que a concentração de pico avaliada nas combinações dos antimicrobianos demonstrou sinergismo em todos os isolados testados, inferindo a eficiência terapêutica das duas drogas testadas em relação a droga pura mais efetiva.

A droga pura mais efetiva na concentração avaliada (pico) foi a PMB em 4/5 isolados. A PMB em 4/5 isolados demonstrou crescimento constante nas primeiras 6 horas, com exceção do isolado 3 que mostrou declínio em seu crescimento. Já nas 6 horas subsequentes 3/5 dos isolados demonstraram aumento em seu crescimento, com exceção do isolado 1 e 2 que permaneceram constantes. Quando completado 24 horas, 4/5 isolados mostraram um perfil de crescimento inferior ao C+ e ao MEM puro.



C+: controle positivo; PM: pico MEM; PP: pico PMB; P+M P: pico PMB+MEM

Figura 1 - Time-Kill curve dos isolados bacterianos de *Acinetobacter baumannii*

Observamos que a segunda droga pura (MEM) na concentração de pico, demonstrou um perfil bem distinto de crescimento em comparação com a PMB. Cerca de 3/5 isolados nas primeiras 6 horas expressaram um aumento em seu crescimento, entretanto, o isolado 2 demonstrou declínio e o isolado 4 manteve um crescimento constante. Já nas 6 horas subsequentes, 2/5 isolados demonstraram constância no crescimento, outros 2 isolados demonstraram aumento e o isolado 3

mostrou um declínio. Ao final das 24 horas 4/5 isolados apresentaram um perfil de aumento no crescimento, tendo 2 desses isolados ultrapassado o crescimento do grupo controle, mostrando assim nenhuma eficácia terapêutica como droga pura a ser utilizada.

A respeito da combinação de ambas as drogas o perfil de crescimento permaneceu o mesmo em todos os isolados, com decaimento acentuado logo nas primeiras 6 horas, demonstrando uma eficiência terapêutica, tendo em vista a diferença $\geq 2 \log_{10}$, caracterizado como sinergismo. Os resultados foram capazes de elucidar a possibilidade de uma alternativa terapêutica, utilizando a combinação do pico sérico de MEM+PMB para esses isolados CRAB, que por si só já são extremamente difíceis de tratar, além da redução das doses terapêuticas por estarem em combinação. Entretanto, por mais viável que seja, ainda urge a necessidade de mais estudos, visto que as concentrações de pico sérico de ambas as drogas em um quadro de regime endovenoso, ainda é muito elevado podendo apresentar toxicidade.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a concentração de pico avaliada, obteve sinergismo quando realizada a combinação de ambas as drogas, sendo esse sinergismo dependente da concentração dos antimicrobianos, e assim pôde ser verificado a morte de CRAB-PMB-R. Ressaltamos assim a necessidade de compreensão das propriedades farmacocinéticas das drogas, assim o sinergismo poderá efetivamente ocorrer, pois somente em concentrações séricas adequadas poderemos ter sucesso terapêutico nas infecções por CRAB-PMB-R.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento científico, assim como a UEM pela oportunidade de realização do projeto.

REFERÊNCIAS

- [1] MOUBARECK, C, A; HALAT, D, H; Insights into: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 119. 9, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/3/119>
- [2] LIU, X; QIN, P; WEN, H; WANG, W; ZHAO, J. Seasonal meropenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and influence of temperature-driven adaptation. **BMC Microbiology**, v. 24, p. 129, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03271-y>.
- [3] LORIAN, V; Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th ed. Baltimore, MD: **Lippincott Williams & Wilkins**; Antimicrobial combinations; p. 366-425, 2005.
- [4] MÜLLER, C ; REUTER, S ; WILLE, J ; *et al.* A global view on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, v. 14, p. 6, 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mbio.02260-23>

[5] UPPALAPATI, S, R; SETT, A; PATHANIA, R; The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. **Front Microbiol.** V.11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.589234>