

SINERGISMO DE ANTIMICROBIANOS CONTRA ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EXTREMAMENTE RESISTENTES

Heloisa de Oliveira Rabelo (PIBIC/UEM), Lucas Guilherme Toshio Takeuti Wada, Bruna Letícia dos Santos Vinha, Rayssa Catelli Rodrigues, Nathalie Kira Tamura, Sheila Alexandra Belini Nishiyama (coorientadora), Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientadora). Email: 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: *Pseudomonas aeruginosa*; *checkerboard*; sinergismo

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa produtoras de New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) – Pa/NDM causam infecções de difícil tratamento, uma vez que são resistentes aos carbapenêmicos e a praticamente todos os antibacterianos de uso clínico. A combinação de antimicrobianos, surge então como uma alternativa terapêutica para o combate às graves infecções por Pa/NDM. O presente estudo avaliou a atividade *in vitro* da associação de Polimixina B (PMB) e Meropenem (MEM) contra 6 isolados de Pa/NDM. A metodologia utilizada foi o método *checkerboard*. Todos os isolados testados eram resistentes ao MEM, com CIMs elevadas variando entre 32-512 µg/mL e 83,33% (5/6) mostraram-se sensíveis a PMB em concentração de 1 µg/mL. Dentre seis isolados testados, a associação mostrou resultados indeterminados para 4/6. Dois isolados (33,33%) apresentaram sinergismo parcial; e nenhuma amostra apresentou antagonismo no uso das duas drogas em conjunto. Além disso, os isolados tiveram redução de MIC de PMB quando em combinação com MEM, sendo que 100% (6/6) das amostras a concentração de PMB diminuiu em combinação ao MEM e 50% (3/6) tiveram uma redução de concentração de MEM quando combinado ao PMB. O FICI para as amostras de Pa-NDM foi 1,25;1,25;1,0;0,75;1,5;0,75 onde o sinergismo verdadeiro é FICI ≤0,5. Apesar de nenhuma amostra apresentar sinergismo entre os antimicrobianos testados, é importante a redução das concentrações de PMB e MEM em combinação. Uma vez que essa redução da MIC diminui a toxicidade da dose administrada no paciente além de reduzir o surgimento de cepas mutantes com genes de resistência.

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* vem se tornando um alerta na saúde pública no mundo todo, uma vez que isolados resistentes aos carbapenêmicos e outros antimicrobianos têm sido cada vez mais descritos globalmente, restringindo as opções terapêuticas e elevando o custo hospitalar. Ainda, esta bactéria tem a capacidade de sobreviver e adaptar-se a diferentes

ambientes, sobrevivendo em superfícies e até mesmo em água (PLUSS-SUARD, C; *et al*).

Nos últimos anos, especialmente durante a pandemia da COVID-19, observou-se o uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos, devido ao grande índice de pacientes internados por COVID-19 que apresentaram infecções secundárias por bactérias (DAMBROSO *et al.*2022). A pressão seletiva favoreceu ao aumento de bactérias extremamente resistentes como *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemase *New Delhi-metallobetalactamase* (NDM)- Pa/NDM de grande risco para a saúde pública. Esta enzima é codificada pelo gene *bla_{NDM}*, e hidrolisa diversas classes de antimicrobianos, e ainda por estar carregada por um plasmídeo possui forte potencial de disseminação (LIVERMORE, DM, 2009).

Decorrente desse cenário e da falta do lançamento de novos antibacterianos mais potente e eficaz contra esses microrganismos produtores de carbapenemases pela indústria farmacêutica, a combinação de antimicrobianos tem sido uma opção tratar infecções por Pa/NDM. O objetivo deste estudo foi realizar *checkerboard* para avaliar a ação sinérgica de polimixina B e meropenem sobre *P. aeruginosa* resistentes à polimixina e produtores de carbapenemase NDM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo analisou a atividade sinérgica da combinação de dois antibióticos de classes diferentes: Polimixina B e Meropenem através do método *checkerboard*. Foram selecionados 6 isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases NDM (Pa-NDM) recuperados de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá para a realização dos testes. Os isolados foram caracterizados como pertencentes a diferentes *clusters* através de tipagem molecular por ERIC-PCR, utilizando o coeficiente de DICE $\leq 0,9$ para a diferenciação. A concentração inibitória mínima (CIM) da polimixina B (PMB) e meropenem (MEM) foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo (MIC) conforme *Clinical and Laboratory Standarts Institute*.

Para sua realização dos testes de *checkerboard*, foi utilizada suspensão bacteriana em caldo *Mueller Hinton Broth* (Difco Laboratories, Sparks, Md, EUA) com cátions ajustados (MHB-CA) e sem antimicrobianos, correspondente a concentração 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). O *checkerboard* é uma metodologia realizada em placas de microdiluição de 96 poços onde múltiplas diluições das 2 drogas são testadas. As placas foram incubadas de 16-20 horas a 35°C. Para avaliação se a associação foi sinérgica, também foi testada a ação individual dos dois antimicrobianos (Lorian *et al.*, 2005). A interpretação dos resultados do *checkerboard* foram classificados de acordo com os critérios propostos por Song *et al.* (2003) como sinergismo ($IFI \leq 0,5$), sinergismo parcial ($IFI > 0,5 < 1$), aditivo ($IFI = 1$), indiferente ($IFI > 1 < 4$) e antagonismo ($IFI \geq 4$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre todas as 6 amostras testadas, 83,33% (5/6) apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) para PMB de 1µg/mL e, 16,66% (1/6) apresentou CIM de 2µg/mL. Embora o objetivo fosse trabalhar com isolados resistentes a PMB, após estocados em freezer e repicados, a CIM diminuiu então continuamos com os

mesmos isolados selecionados, porém agora todos sensíveis a PMB. Ainda, todos os isolados possuíam o gene *bla_{NDM}* e eram 100%, resistentes ao MEM, com CIMs para este antimicrobiano elevadas variando de 32-512µg/mL (Tabela1).

Em relação aos resultados de *checkerboard*, 66,66% (4/6) das amostras apresentaram resultados indeterminados de FICI; 33,33% (2/6) demonstraram sinergismo parcial (Pa 890 e Vigi 1625). Nenhuma amostra apresentou resultado antagônico com a combinação dos fármacos. Os resultados de FICI de para interpretação estão descritos na tabela 1.

Para todos os isolados de CIM de PMB diminuiu em combinação ao MEM quando comparadas a PMB pura e para 50% (3/6) dos isolados houve também a redução da CIM MEM quando combinado com a PMB, demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Associação de polimixina B com meropenem: CIM dos antimicrobianos isolados e combinados e suas respectivas interações pelo método de *checkerboard*

Isolados	Genes resistência	CIM (µg/mL)			
		PMB	MEM	POL/MERO	FICI
Pa 765	<i>bla_{NDM}</i>	1 (S)	128 (R)	0,25/128 (S/R)	1,25 (IND)
Pa 711	<i>bla_{NDM}</i>	1(S)	32(R)	0,25/32 (S/R)	1,25 (IND)
Pa 871	<i>bla_{NDM}</i>	1(S)	64(R)	0,5/32 (S/R)	1,0 (IND)
Pa 890	<i>bla_{NDM}</i>	1(S)	512(R)	0,5/32 (S/R)	0,75 (SP)
Vigi 1766	<i>bla_{NDM}</i>	1(S)	128(R)	0,5/128 (S/R)	1,5 (IND)
Vigi 1625	<i>bla_{NDM}</i>	2(S)	512(R)	0,5/256 (S/R)	0,75 (SP)

CIM: concentração inibitória mínima FICI ≤ 0,5: Sinergismo; 0,5 < FICI < 4: Indiferença; FICI ≥ 4: Antagonismo.

Ao estudarmos a terapia antimicrobiana, não podemos nos esquecer de interpretar que para combate da infecção precisamos que a concentração do antimicrobianos seja adequada no sítio infeccioso. Esta concentração, dependendo do fármaco pode ser maior ou menor no sítio infeccioso do que no soro. A MPC é definida como a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento de bactérias mutantes resistentes, sendo definida também como a CIM das bactérias mais resistentes, ou seja, daquelas com maior probabilidade de terem pelo menos uma mutação. O crescimento de mutantes resistentes ocorre em uma área chamada de janela de seleção de mutantes (MSW), sendo essa definida como o intervalo de concentração entre a CIM e MPC do antimicrobiano onde, a subpopulação de mutantes resistentes é seletivamente amplificada. De acordo com essa proposta, manter as concentrações acima da MPC durante a terapia limitará o aparecimento de resistência e ao mesmo tempo alcançará o efeito terapêutico. A PMB é um fármaco com estreito índice terapêutico, onde o surgimento de mutantes ocorre até mesmo em isolados sensíveis, assim realizar a monoterapia visando atingir a MPC pode não ser seguro devido a toxicidade assim a combinação com MEM embora não seja sinérgica favoreceu a queda da CIM de PMB aumentando a chance de sucesso terapêutico.

Assim, a terapia combinada de antimicrobianos pode ser uma alternativa para que haja a redução da MSW, enquanto as concentrações são mantidas acima da MPC. Baseando-se nesse contexto, a queda da CIM da PMB combinada ao MEM nesse estudo foi muito importante uma vez embora tenha ocorrido apenas sinergismo parcial ou indiferença na associação e PMB e MEM contra Pa/NDM, para todos os isolados foi verificada a diminuição da CIM do antimicrobiano em combinação. Isso diminui o surgimento de isolados resistentes e a toxicidade do antimicrobiano no paciente.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados a respeito da interação entre dois fármacos frente às amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de NDM, mostrou que o sinergismo verdadeiro entre a PMB e o MEM não ocorreu para nenhum isolado testado. No entanto, a combinação dos dois fármacos foi benéfica, apresentando sinergismo parcial ou indiferença, mas sempre com a redução de CIM de PMB ou ainda em alguns isolados com o resgate da ação do MEM em isolados produtores carbapenemases. Os dados de diminuição da CIM são importantes por aumentar as chances de sucesso terapêutico no tratamento de infecções causadas por Pa/NDM.

AGRADECIMENTOS

A UEM pelo apoio financeiro no projeto.

REFERÊNCIAS

SONG, W; WOO, H.J; KIM, J.S; LEE, K.M. In vitro activity of β -lactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 8-12, jan. 2003. Elsevier BV. Disponível em [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579\(02\)00269-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579(02)00269-8).

PLÜSS-SUARD, C.; PANNATIER, A.; KRONENBERG, A.; MÜHLEMANN, K.; ZANETTI, G. Impact of Antibiotic Use on Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: is there a role for antibiotic diversity?. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 1709-1713, abr. 2013. American Society for Microbiology. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01348-12>.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

LIVERMORE, David M.. Fourteen years in resistance. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 283-294, abr. 2012. Elsevier BV. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012>.

DAMBROSO-ALTAFINI, D. et al. Overuse of empirical antibiotics in a Covid-19 intensive care unit led to the spread of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in a teaching hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.30, p.100-

102, 2022 Elsevier BV. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2022.06.006>.