SINERGISMO DE ANTIBACTERIANOS CONTRA ISOLADOS MULTIRRESISTENTES DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS CO-PRODUTORAS DAS CARBAPENEMASES KPC E NDM

Letícia de Andrade Cunha (PIBIC/CNPq), Lucas Guilherme Toshio Takeuti Wada, Giordana Portes Gomes, Mirian Nicéa Zarpellon, Sheila Alexandra Belini Nishiyama, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientador). E-mail: mcbtognim@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Ciências Biológicas/ Microbiologia Aplicada/ Microbiologia Médica

Palavras-chave: sinergismo antimicrobiano*; checkerboard;* resistência bacteriana.

RESUMO

O aumento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas carreadoras dos genes de carbapenemases *bla*$_{KPC}$ ou *bla*$_{NDM}$ ou ambos (*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$) é uma preocupação mundial e de difícil tratamento. O resgate de antimicrobianos mais "antigos" e suas combinações com outros antibacterianos é uma alternativa promissora contra essas bactérias. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade sinérgica entre antimicrobianos contra isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Providencia stuartii* produtores de carbapenemase. As combinações dos fármacos foram feitas em duplicata pelo método *checkerboard*, utilizando as associações possíveis entre meropenem, fosfomicina, polimixina B e tigeciclina. As combinações fosfomicina+meropenem e tigeciclina+polimixina B apresentaram maior atividade sinérgica, com sinergismo em 82% e 64% das amostras, respectivamente. A combinação de meropenem+polimixina B teve o pior desempenho no estudo, com 27% de sinergismo para as amostras testadas. Não houve antagonismo entre os antibacterianos utilizados. Conclui-se que as combinações *in vitro* de antimicrobianos contra isolados carreadores dos genes de carbapenemases apresentaram resultados promissores.

INTRODUÇÃO

O aumento crescente de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes é uma grande preocupação da saúde pública atual. A produção de enzimas carbapenemases, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *New Delhi Metallo-beta-lactamase* (NDM), contribui a resistência e disseminação bacteriana, principalmente em ambientes hospitalares (THOMAS *et al.* 2022). A coprodução dessas enzimas reduz as opções terapêuticas disponíveis.

Nesse contexto, o uso de antimicrobianos "antigos", como a polimixina B (PMB) e fosfomicina (FOS), apresentam potencial terapêutico, principalmente em combinação com outros antibióticos (NANG *et al.* 2021).

Assim, analisamos a combinação sinérgica de fármacos e sua ação contra isolados bacterianos coprodutores de KPC e NDM, a fim de aumentar a cobertura antibacteriana, reduzir a seleção de mutantes resistentes e os efeitos adversos nos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas isolados bacterianos de *Escherichia coli* (Ec), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Morganella morganii* (Mn), *Proteus mirabilis* (Pm) e *Providencia stuartii* (Prs) e alguns representantes de swab de vigilância (VIGI) destas espécies recuperados de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Regional de Maringá. Estes isolados ou possuíam resistência intrínseca a polimixina B e/ou os genes bla_{KPC} e bla_{NDM}. Foi realizada *polimerase chain reaction* PCR do tipo mu*ltiplex* para confirmar a presença dos genes bla_{KPC} e bla_{NDM} em todos os isolados. Já para isolados de Kp também foi realizada a tipagem por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*- ERIC-PCR, para diferenciação genética e seleção de solados mais distintos.

De todos os isolados foi determinada a *Minimal Inhibitory concentracion* (MIC) dos antibacterianos selecionados fosfomicina, meropenem, polimixina B e tigeciclina. A combinação dos antimicrobianos foi feita em duplicata pelo método *checkerboard* em placas de microdiluição de 96 poços utilizando-se como meio de cultura *Mueller Hinton* cátions ajustados (MHB-CA), em que nas colunas, a droga A foi diluída e nas linhas, a droga B foi diluída. A placa foi incubada em agitação durante cerca de 16 a 18 horas, a 37°C.

Resultados das associações dos antibacterianos foram interpretados a partir da *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) calculada da seguinte maneira: Primeiro calculou-se o FIC de cada antibiótico. Para o antibiótico A: FICA = MIC de A em combinação/ MIC de A isolado e para o antibiótico B: FICB = MIC de B na combinação/ MIC de B isolado. Então FICI = FICA + FICB onde FICI ≤ 0,5 = sinergismo; 0,5 < FICI ≤ 4 = indiferente; e FICI > 4 = antagonismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os isolados de Kp bla_{KPC}+bla_{NDM} (21 total) selecionou-se cinco com maior diferenciação genotípica pelo ERIC-PCR. A MIC dos antibacterianos foi determinada por microdiluição: (Tabela 1). Posteriormente foi realizado o teste para avaliação do sinergismo *checkerboard* para todas as possíveis associações dos antimicrobianos. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2 e expressos em FICI conforme descrito na metodologia.

Os resultados experimentais demonstraram que a combinação *in vitro* que obteve maior sinergismo foi a de FOS X MEM, com 82% de atividade sinérgica. Essa combinação farmacológica também tem sido descrita, em outros estudos, como

eficaz contra isolados multirresistentes com as carbapenemases KPC e NDM (DOBREVA *et al*. 2022). Em sequência, a combinação mais efetiva foi TGC x PMB, com 64%. FOS x TGC e FOS x PMB apresentaram relativa taxa de atividade sinérgica, com 55%, 45%, respectivamente, já a associação de MEM x TGC obteve 35% de sinergismo.

Tabela 1. MIC dos antibacterianos frentes aos isolados bacterianos estudados

Isolados	Gene de resistência	MIC dos antimicrobianos			
		MEM	PMB	FOS	TGC
Kp 449	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	32 (R)	1 (S)	256 (R)	1 (S)
Kp 508	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	32 (R)	2 (S)	256 (R)	1 (S)
Kp 529	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	128 (R)	0,5 (S)	32 (S)	8 (R)
Kp 719	*bla*$_{NDM}$	512 (R)	1024 (R)	256 (R)	4 (R)
Kp 844	*bla*$_{KPC}$	256 (R)	128 (R)	256 (R)	8 (R)
Pm 76	*bla*$_{NDM}$	256 (R)	1024 (R)	128 (I)	8 (R)
Prs 03	*bla*$_{NDM}$	512 (R)	1024 (R)	128 (I)	8 (R)
VIGI 782 - Kp	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	64 (R)	8 (R)	128 (I)	1 (I)
VIGI 934 - Kp	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	128 (R)	0,5 (S)	64 (S)	4 (R)
VIGI 2177 - Mn	*bla*$_{NDM}$	256 (R)	1024 (R)	512 (R)	8 (R)
VIGI 2405 - Ec	*bla*$_{KPC}$	256 (R)	64 (R)	64 (S)	0,5 (I)

Minimal Inhibitory concentracion (MIC). S (sensível); I (Sensível, aumentado exposição); R (resistente); MEM: meropenem; PMB: polimixina B; FOS: fosfomicina; TGC: tigeciclina; Meropenem (S ≤1,I=2, R≥4); Polimixina B (S ≤2, R ≥4); Fosfomicina (S ≤64,I=128, R ≥256); Tigeciclina (S ≤1, R ≥2);

Tabela 2. Resultados obtidos pelo método *checkerboard* de combinação in vitro de antimicrobianos dos isolados bacterianos.

Isolados	Gene de resistência	FICI da combinação entre antibacterianos (*)					
		MEM+PMB	MEM+FOS	MEM+TGC	PMB+FOS	PMB+TGC	FOS+TGC
Kp 449	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	0,75 (I)	0,1875 (S)	0,75 (I)	0,156 (S)	0,5 (S)	0,156 (S)
Kp 508	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	0,375 (S)	0,3125 (S)	0,75 (I)	0,09 (S)	0,375 (S)	0,75 (I)
Kp 529	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	1 (I)	0,1562 (S)	0,375 (S)	0,75 (I)	0,312 (S)	0,265 (S)
Kp 719	*bla*$_{NDM}$	0,125 (S)	1 (I)	0,5156 (I)	0,1875 (S)	0,2519 (S)	1,0312 (I)
Kp 844	*bla*$_{KPC}$	2 (I)	0,2578 (S)	0,093 (S)	2 (I)	0,1875 (S)	0,625 (I)
Pm 75	*bla*$_{NDM}$	1 (I)	0,5312 (I)	0,4106 (S)	0,2578 (S)	1,5 (I)	0,5078 (S)
Prs 03	*bla*$_{NDM}$	1 (I)	0,0468 (S)	0,5156 (I)	0,375 (S)	2 (I)	0,25 (S)
VIGI 782	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	0,1562 (S)	0,3125 (S)	0,75 (I)	0,625 (I)	0,265 (S)	0,312 (S)
VIGI 934	*bla*$_{KPC}$+*bla*$_{NDM}$	0,5312 (I)	0,1875 (S)	1 (I)	0,625 (I)	0,132 (S)	0,75 (I)
VIGI 2177	*bla*$_{NDM}$	0,75 (I)	0,0332 (S)	0,5078 (S)	2 (I)	1,5 (I)	0,625 (S)
VIGI 2405	*bla*$_{KPC}$	0,5625 (I)	0,25 (S)	1,5 (I)	0,625 (I)	1,5 (I)	1,5 (I)

MEM: meropenem; PMB: polimixina B; FOS: fosfomicina; TGC: tigeciclina; FICI (*): índice da fração da concentração e efeito produzido; S: sinergismo; I: indiferença;

A associação que apresentou menor taxa de atividade sinérgica em nosso estudo foi PMB x MEM, com sinergismo de 27%. Apesar dessa combinação ser amplamente utilizada na prática clínica em bacilos Gram negativos (GOMEZ-SIMMONDS *et al*., 2016), um estudo publicado em 2019 também demonstrou que essa combinação não apresenta efeito sinérgico, quando utilizada de forma simultânea (KULENGOWSKI *et al*., 2019). Recente estudo de 2026 demonstrou que

esta associação contra isolados de *Acinetobacter baumannii* embora fosse sinérgica *in vitro* não atingia eficácia adequada em cepas resistentes com carbapenemases como são nossos isolados (SOEORG *et al*., 2026)

Considerando as raras opções terapêuticas para o tratamento contra infecções por bactérias resistentes a PMB e portadoras dos genes bla_{KPC} e $bla_{NDM,}$ nossos resultados se mostram de grande importância, já que demonstram atividade sinérgica em variadas combinações entre os antimicrobianos, sem nenhum antagonismo.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados são promissores pois utilizamos neste estudo bactérias praticamente intratáveis com resistência tanto a MEM (genes bla_{KPC}, bla_{NDM} ou ambos) quanto a PMB (adquirida ou intrínseca). A melhor atividade sinérgica ocorreu entre FOS e MEM. Destacamos que FOS tem sido resgatada com um fármaco essencial na era da resistência bacteriana principalmente, com a perspectiva da fórmula farmacêutica intravenosa de FOS como já presente em outros países pois atualmente no Brasil temos apenas a formulação oral, e assim possa ser utilizada em combinações contra essas bactérias multirresistentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo apoio ao desenvolvimento científico brasileiro.

REFERÊNCIAS

DOBREVA, E. *et al.* In vitro Investigation of Antibiotic Combinations against Multi- and Extensively Drug-Resistant Klebsiella pneumoniae. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, *[S. l.]*, v. 10, n. B, p. 1308–1314, 2022. DOI: 10.3889/oamjms.2022.8934.

GOMEZ-SIMMONDS, A. *et al.*. Combination regimens for treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 60, n. 6, p. 3601-3607, 2016.

NANG, S., AZAD, M., VELKOV, T., ZHOU, Q., LI, J. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. **PHARMACOLOGICAL REVIEWS**., vol. 73, n. 2, pag. 679-728, abr. 2021

THOMAS, G. R., *et al*. Increased Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. **Emerg Infect Dis**. vol. 28, n. 11, pag. 1-8, nov. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3201/eid2811.220415. Acesso em: 12 ago. 2026.

SOEORG, H.; LYU, S.; KLOPROGGE, F.; STANDING, J. F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using combined time-kill data for meropenem and colistin or polymyxin B combination effects in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 70, n. 7, 2026. e0027426. DOI: 10.1128/aac.00274-26.