

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Avaliação do sinergismo entre polimixina B com tigeciclina, imipenem e meropenem em isolados de enterobactérias produtoras de KPC**

**Natália Barth**

**Dissertação de Mestrado**

**Dezembro, 2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Avaliação do sinergismo entre polimixina B com tigeciclina, imipenem e meropenem  
em isolados de enterobactérias produtoras de KPC

Natália Barth

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn  
Zavascki

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

### CIP - Catalogação na Publicação

Barth, Natália

Avaliação do sinergismo entre polimixina B com tigeciclina, imipenem e meropenem em isolados de enterobactérias produtoras de KPC / Natália Barth. -- 2014.

59 f.

Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Sinergismo. 2. Polimixina B. 3. Carbapenêmicos. 4. Tigeciclina. 5. KPC. I. Zavascki, Alexandre Prehn, orient. II. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

Professor Dr. Afonso Luís Barth

Professor Dr. Luciano Zubaran Goldani

Professora Dr<sup>a</sup> Andreza Francisco Martins

Professor Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez

## RESUMO

Enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. estão entre as principais causas de infecções hospitalares e estão frequentemente associadas à produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). A emergência de isolados produtores desta e de outras carbapenemases é um grave problema de saúde pública uma vez que as opções terapêuticas tornam-se extremamente limitadas. As polimixinas frequentemente constituem uma das poucas opções disponíveis, porém têm sido associadas a menor eficácia clínica, maior mortalidade e toxicidade. Além disso, há descrição *in vitro* da emergência de subpopulações heterorresistentes de isolados expostos a esta droga. Neste contexto, muitos estudos têm avaliado a terapia combinada como alternativa e a utilização das polimixinas com outras classes de antimicrobianos tem mostrado resultados mais eficazes em comparação às monoterapias no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, como aquelas produtoras KPC. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de combinações entre polimixina B (PMB) com a tigeciclina (TGC) e com os carbapenêmicos imipenem (IPM) e meropenem (MEM) contra enterobactérias produtoras de KPC-2 pelo método de *Time Kill Curves* - TKC (Curva de Tempo-Morte). Os isolados foram previamente caracterizados como produtores de KPC-2 e incluíram seis clones de três espécies distintas, sendo dois isolados de *K. pneumoniae* (KP), dois de *Enterobacter cloacae* (EC) e dois de *Serratia marcescens* (SM), provenientes de banco de amostras. A PMB foi testada em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL, enquanto os carbapenêmicos e TGC foram testados a uma concentração fixa de 4,0 e 1,0 µg/mL, respectivamente. Os tubos contendo o inóculo e antibióticos foram incubados a 35 °C e uma alíquota foi semeada em placa de ágar sangue nos tempos: 0, 0,25, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, para a contagem das colônias. Os resultados foram interpretados conforme as seguintes definições: i) atividade bactericida = redução  $\geq 3 \log_{10}$  na contagem total de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL comparado ao inóculo inicial; ii) atividade bacteriostática = manutenção ou redução  $< 3 \log_{10}$  na contagem total de UFC/mL comparado ao inóculo original; iii) sinergismo = diminuição  $\geq 2 \log_{10}$  na contagem total de UFC/mL entre a combinação de antimicrobianos e o agente mais ativo, após 24 horas de incubação. De acordo com nossos resultados, IPM, MEM e TGC não apresentaram efeito bacteriostático ou bactericida quando testados como

única droga contra todos os isolados produtores de KPC-2. Todas as combinações de antibióticos mostraram sinergismo com atividade bactericida ou, pelo menos, um efeito bacteriostático para todos os isolados testados, sendo as combinações mais efetivas aquelas onde a de PMB foi usada nas concentrações de 1,0 e 2,0 µg/mL e combinada aos carbapenêmicos. Embora tenham sido observadas concentrações inibitórias mínimas elevadas para PMB contra os isolados de SM, para ambas as cepas houve sinergismo quando a PMB foi combinada a IPM e MEM. Nossos resultados confirmam a superioridade das combinações de antimicrobianos em comparação às monoterapias e sugerem que, a PMB combinada com carbapenêmicos ou TCG pode ser uma opção terapêutica eficaz para o tratamento de infecções causadas por isolados de enterobactérias produtores de KPC-2.

**Palavras-chave:** Sinergismo, KPC, enterobactérias, polimixina B, carbapenêmicos, tigeciclina.

## ABSTRACT

Enterobacteria such as *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. are among the leading causes of nosocomial infections and are often associated with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) production. The emergence of KPC and other carbapenemases is a serious public health problem due to the limited therapeutic. Polymyxins often constitute one of the few options available, but it have been associated with lower clinical efficacy, toxicity and increased mortality. Moreover, several studies have demonstrated the emergence of heteroresistant subpopulations when isolates are exposed to this drug. In this context, some authors have evaluated the combined therapy as an alternative and the use of polymyxins with other classes of antibiotics have shown to be more effective compared to the monotherapies for the treatment of infections caused by multiresistant bacteria. Therefore, the aim of this study was to evaluate the performance of polymyxin B (PMB) with carbapenems imipenem (IPM) and meropenem (MEM) and tigecycline (TGC) combinations against KPC-2 producing *Enterobacteriaceae* by Time Kill Curves method. Isolates were previously characterized as KPC-2 producing comprising six distinct clones that included: two *K. pneumoniae* (KP), two *Enterobacter cloacae* (EC) and two *Serratia marcescens* (SM). PMB was tested at concentrations 0,5, 1,0 and 2,0 µg/mL, whereas carbapenems and TGC were tested at a fixed concentration of 4.0 and 1.0 µg/mL, respectively. Tubes with inoculum and antibiotics were incubated at 35 °C and an aliquot was plated on blood agar plates at times: 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours for counting colonies. The results were interpreted according to the following definitions: i) bactericidal activity =  $\geq 3 \log_{10}$  reduction in total count of colony forming units (CFU)/mL compared to the initial inoculum; ii) bacteriostatic activity = maintenance or reduction  $< 3 \log_{10}$  in total count of CFU/mL compared to the original inoculum; iii) synergism =  $\geq 2 \log_{10}$  decrease in total count of CFU/ml between the combination and the most active antimicrobial agent after 24 hours of incubation. According to our results, IPM, MEM and TGC showed no bacteriostatic or bactericidal effects when tested as a single drug against all KPC-2-producing isolates. All combinations of antibiotics showed synergism with bactericidal activity or at least, a bacteriostatic effect for all the six isolates. The more effective combinations were those that PMB was used at 1,0 and 2,0 µg/mL, combined with carbapenems. Although high minimum inhibitory concentrations were observed for PMB against

isolates of SM, for both strains, synergism was observed when PMB was combined with IPM and MEM. Our results confirm the superiority of antimicrobial combinations compared to monotherapies and suggest that PMB combined with carbapenem or TCG can be an effective therapeutic option for the treatment of infections caused by KPC-2-producing *Enterobacteriaceae*.

**Key words:** Synergism, KPC, enterobacteria, polymixin B, carbapenems, tigecycline.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. ....	16
Figura 2 - Esquema marco teórico. ....	26

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Minimum inhibitory concentrations of KPC-2 producing isolates .....	47
Table 2. The 24h change in bacterial count after exposure to PMB, IPM, MEM and TGC alone and in combination. ....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CB – *Checkerboard*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EC – *Enterobacter cloacae*

DORI – Doripenem

EKPC – Enterobactérias produtoras de KPC

ERT - Ertapenem

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IPM – Imipenem

KP – *Klebsiella pneumoniae*

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS – Lipopolissacarídeo

MEM – Meropenem

CIM – Concentração inibitória mínima

PAE – Efeito pós-antibiótico (*post-antibiotic effect*)

PBP – Proteínas ligadoras de penicilina (*penicilina binding proteins*)

PFGE – Eletroforese de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*)

PMB – Polimixina B

SM – *Serratia marcescens*

TGC – Tigeciclina

TKA – *Time kill assay*

TKC – *Time kill curves*

UFC – Unidade formadora de colônia

VIM – Verona *integron-encoded* metallo-beta-lactamase

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Alexandre Prehn Zavascki, por ser um exemplo de pesquisador, pela oportunidade de crescimento profissional, por todo o conhecimento a mim passado, pelo apoio e orientação.

À minha grande amiga e colaboradora Vanessa Bley Ribeiro por todo o apoio e incentivo desde meu ingresso no HCPA e UFRGS, pelas horas de estudos e explicações necessárias para a realização deste trabalho, pela troca de experiências, pela amizade eterna e por acreditar em mim até mais do que eu mesma.

À colega de mestrado e amiga Bárbara Netto por me ensinar a técnica e pela ajuda na parte prática.

Aos amigos do Centro de Pesquisa Experimental, em especial Everaldo, Roger e Jeferson.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Exato Rosetti e do Centro de Medicina Laboratorial do Hospital Montenegro pelo apoio e incentivo.

À minha avó Ercy Torres da Silva, pelo exemplo de garra, sabedoria, perseverança, coragem, inteligência e acima de tudo amor. Por estar sempre ao meu lado, por ter me ensinado que o estudo é única coisa que levamos na vida.

Ao meu amor Matheus, por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos, pela paciência, pela espera, pelo amor dedicado. Por ser um excelente estagiário me ajudando na parte prática deste trabalho e, acima de tudo, por me fazer feliz sempre.

“Sejam quais forem os resultados, com êxito ou não, o importante é que no final  
cada um possa dizer: fiz o que pude.”

*Louis Pasteur*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES.....	15
2.2 FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> – CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA .....	17
2.3 CARBAPENÊMICOS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR ENTEROBACTÉRIAS .....	18
<b>2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos em <i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.2 Alternativas no tratamento de isolados produtores de KPC</b> .....	<b>21</b>
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COMBINAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS - TESTE DE SINERGISMO.....	23
<b>3 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>26</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 OBJETIVO GERAL .....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>7 MANUSCRITO</b> .....	<b>37</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>49</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>50</b>
<b>10 ANEXOS</b> .....	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. são importantes patógenos comunitários e hospitalares e podem ser isoladas de diversos sítios anatômicos. São causadoras de cerca de 30 a 35% dos casos de sepse e mais de 70% das infecções das vias urinárias e intestinais, podendo também causar pneumonias e meningites, constituindo assim importantes agentes causadores de infecções hospitalares (1).

A resistência a antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae* tem se tornado um problema de saúde pública com o aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, cujas opções terapêuticas tornam-se extremamente limitadas (2,3). A enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos na família *Enterobacteriaceae*. A KPC é uma carbapenemase de classe A que confere resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapênemicos constituindo, portanto, uma das carbapenemases de maior importância clínica e epidemiológica na atualidade (4–6). A KPC já foi identificada em todos os continentes e tem sido responsável por surtos hospitalares em diversos países (7–9), inclusive no Brasil (10–12). Considerando as poucas opções para o tratamento de infecções causadas por isolados produtores de KPC, a polimixina B (PMB) e a tigeciclina (TGC) constituem os principais arsenais terapêuticos disponíveis para o tratamento (6,13,14).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o sinergismo entre a PMB e TGC, imipenem ou meropenem contra seis isolados de enterobactérias produtoras de KPC (EKPC), pelo método de Curvas de Tempo-Morte bacteriana (*Time Kill Curves* - TKC), onde a PMB foi combinada em concentrações subinibitórias, escolhidas considerando os níveis de droga não ligada alcançados no soro em regimes de administração de altas doses de antimicrobiano.

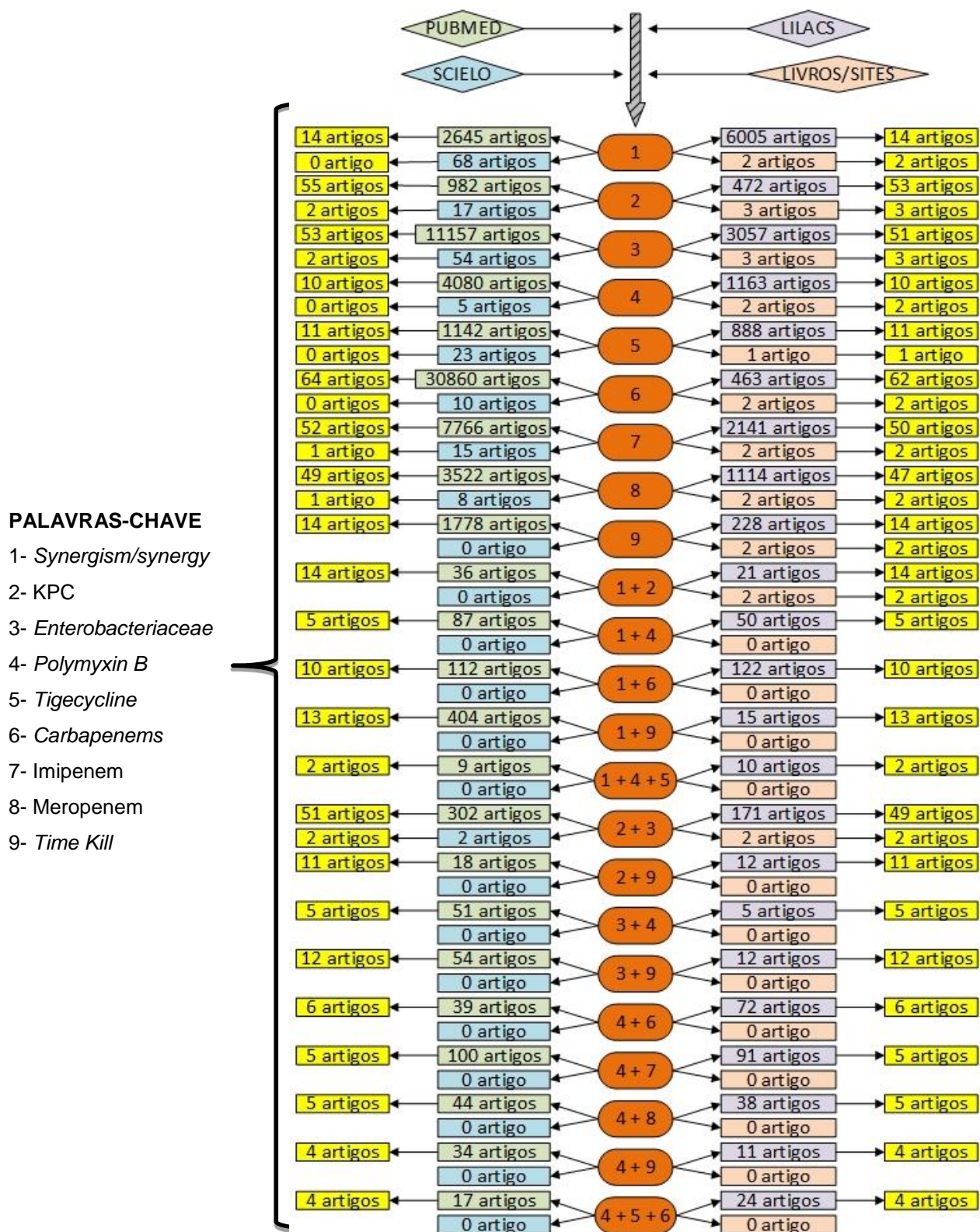
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Este trabalho está focado na avaliação da presença de atividade sinérgica, bactericida e bacteriostática entre as combinações de PMB com TGC, IPM e MEM em enterobactérias produtoras de KPC. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, SciELO, livros de microbiologia e sites de organizações ligadas à microbiologia, sem data inicial de publicação até 2014. Foram realizadas buscas através dos termos “synergism/synergy”, “KPC”, “*Enterobacteriaceae*”, “*polymyxin B*”, “*tigecycline*”, “imipenem”, “meropenem”, “*time kill*” e suas variações em português, conforme demonstrado na Figura 1.



Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo



Fonte: Elaborado pela Autora (2014)

As caixas externas indicam os artigos que foram incluídos na revisão de acordo com os critérios de inclusão, tendo sinergismo e polimixina B como fator de estudo e *time kill*, KPC e carbapenêmicos como desfechos. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave.

## 2.2 FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE* – CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

As enterobactérias são bacilos gram-negativos fermentadores da glicose que se caracterizam por serem anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa, e por não possuírem exigências nutricionais complexas, podendo ser cultivadas em diversos meios de cultura. Habitam tanto solo, vegetação, água e a região do trato gastrointestinal de vários animais, inclusive o homem, no entanto algumas espécies são patógenos obrigatórios. Mesmo possuindo características gerais a todas as espécies, a família *Enterobacteriaceae* é extremamente diversa, abrangendo gêneros e espécies que se diferenciam pela capacidade de fermentação de uma série de outros carboidratos, pela produção de toxinas ou por suas características antigênicas (1,15).

As espécies de maior importância clínica compreendem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., dos quais alguns estão entre os principais microrganismos associados a infecções hospitalares. Alguns estudos confirmam que *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados em infecções de corrente sanguínea, urinárias, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções de sítio cirúrgico, entre outras (1,16,17).

Embora com menor prevalência, espécies como *S. marcescens*, *Proteus* spp. e *Morganella* spp. também são frequentemente isoladas e podem estar relacionadas a quadros infecciosos graves. Uma vez que possuem perfis característicos de sensibilidade aos antimicrobianos, sua inclusão em estudos investigativos é de suma importância (16–19).

A emergência de cepas pan-resistentes de *Klebsiella* spp. tem sido relatada mundialmente e a presença de carbapenemases já foi descrita em praticamente todos os membros da Família *Enterobacteriaceae* (20). Desta forma, tornam-se extremamente importantes os estudos com novos antibióticos e também com a combinação de antibióticos já utilizados na clínica.

### 2.3 CARBAPENÊMICOS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR ENTEROBACTÉRIAS

A partir do final da década de 80, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, foram instituídos como alternativas terapêuticas de primeira escolha para tratamento de infecções graves provocadas por bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e com hiperexpressão de AmpC, por serem resistentes a degradação destas enzimas (21,22). Os carbapenêmicos são antimicrobianos caracterizados pelo seu amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e atuam inibindo a síntese da parede celular através da ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Ao longo das últimas décadas, diversos carbapenêmicos foram descobertos (23–28), além de outros tantos que ainda estão em desenvolvimento, como o Tebipenem-pivoxil (29). No entanto, atualmente quatro são os antibióticos desta classe que têm o seu uso aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA): imipenem (IPM), meropenem (MEM), ertapenem (ERT) e doripenem (DORI) (30).

A dependência da utilização dos carbapenêmicos tornou-se crescente devido ao aumento expressivo de bactérias gram negativas produtoras de ESBL ou hiperprodutoras de AmpC, pois estas enzimas hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (31).

Guzek et al. (32) analisaram as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de 99 isolados de *Enterobacteriaceae* frente ao ertapenem, imipenem e meropenem. Os isolados incluíam 51 *E. coli* (51.52%), 14 *E. cloacae* (14.14%), 12 *K. pneumoniae* (12.12%), 7 *M. morgani* (7.07%), 4 *C. freundii* (4.04%), 5 *K. oxytoca* (5.05%) e dois (2.02%) *C. braakii*, *Proteus* spp e *S. marcescens*. Todos os isolados foram suscetíveis ao meropenem, uma *M. morgani* foi resistente ao imipenem e um *E. cloacae* e uma *K. pneumoniae* foram resistentes ao ertapenem. O mecanismo de resistência ESBL foi encontrado em 58,7% das *K. pneumoniae*, 25% dos *C. freundii*, 7,14% dos *E. cloacae* e 1,06% das *E. coli*. Todos os isolados ESBL+ foram sensíveis aos carbapenêmicos em concentrações subinibitórias, inclusive quando os mesmos foram testados em valores de CIM50 e CIM90, indicando que os carbapenêmicos ainda são boas opções terapêuticas para o tratamento de bactérias produtoras de ESBL.

Chen et al. (33) testaram a eficácia de géis com baixa concentração de imipenem (2-10µg/mL) e altas concentrações de imipenem (200-1000 µg/mL) de reduzirem a produção de biofilmes de *K. pneumoniae in vitro* (por crescimento em garrafas de cultura) e *in vivo* com implante da bactéria no músculo esquelético de ratos. O gel de alta concentração foi capaz de reduzir a formação de biofilme em todos os experimentos, mostrando que o imipenem pode ser usado para o controle de feridas infectadas por *K. pneumoniae* produtora de biofilmes.

Trivedi et al. comparou o tratamento com carbapenêmicos versus não-carbapenêmicos em pacientes portadores de diversos tipos de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL. O estudo demonstrou que os antibióticos não-carbapenêmicos obtiveram eficácia de 79,6%, enquanto os carbapenêmicos obtiveram eficácia clínica de 85,7%, demonstrando a superioridade dos carbapenêmicos no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL (34).

Concordando com estes estudos Maherault et al. (35) reportaram o caso de uma senhora admitida em unidade de terapia intensiva por choque séptico e pancreatite aguda tratada empiricamente com ertapenem. No 12º dia de internação foi coletado um swab retal onde foi identificada uma *K. pneumoniae* multirresistente e aos 24 dias de internação a paciente apresentou febre com hemocultura de cateter positiva para o mesmo microorganismo. A cepa foi identificada como produtora da carbapenemase OXA-48, com resistência a ertapenem (CIM de 4mg/L), mas sensível a imipenem (CIM de 0.38mg/L). O tratamento foi modificado para imipenem e após 12 dias todas as hemoculturas deram resultado negativo. Apesar de esta situação ser amplamente discutida na área clínica, este estudo mostra que uma bactéria produtora de carbapenemase, talvez possa ser tratada com carbapenêmicos se apresentar sensibilidade *in vitro* para algum destes antibióticos.

Apesar de os carbapenêmicos serem ótimas opções para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL e hiperprodutoras de AmpC, a frequência cada vez maior de enterobactérias resistentes a estes antibióticos constitui um dos principais desafios aos laboratórios clínicos e às equipes médicas atualmente.

### 2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*

Como resultado da pressão seletiva, nas últimas décadas a resistência aos carbapenêmicos tem sido relacionada a surtos de infecções hospitalares por todo o mundo (36–38). Segundo dados do SENTRY, no Brasil, o gênero *Klebsiella* spp. é o que apresenta menor sensibilidade ao IPM e MEM (88,7% e 88,9% respectivamente), quando comparado aos demais países latino-americanos avaliados, cujos percentuais variaram entre 92% e 99% (17).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência aos carbapenêmicos, desde alterações dos alvos de ligação das PBP's, hiperexpressão de bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana externa, até a produção de enzimas capazes de promover a hidrólise dos carbapenêmicos (39,40). Dentre estes mecanismos, as alterações de permeabilidade da membrana, bem como a produção de carbapenemases constituem os dois principais e mais frequentes mecanismos de resistência aos carbapenêmicos na família *Enterobacteriaceae* (41,42).

Dentre as carbapenemases, a KPC está entre as mais importantes clinicamente na família *Enterobacteriaceae*, devido a sua distribuição global e aumentada taxa de hidrólise dos carbapenêmicos (3). As KPCs conferem resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos e, na sua grande maioria, são enzimas codificadas por plasmídeos móveis, o que facilita a transferência do gene interespecie e, conseqüentemente, acentua o seu potencial de disseminação (43,44). Estas enzimas já foram identificadas em praticamente todos os membros de importância clínica da família *Enterobacteriaceae* e, inclusive, em espécies de não-fermentadores, como a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Acinetobacter baumannii* (45–49).

Até o momento, já foram descritas 21 variantes desta enzima (KPC-2 a KPC-22) (50), já que em 2008 evidenciou-se que as enzimas KPC-1 e KPC-2 possuíam a mesma sequência. Atualmente, a KPC-2 é uma das enzimas de maior prevalência mundial, presente em todos os continentes e associada a surtos hospitalares em diversos países (3,7,45,51).

No Brasil, os primeiros relatos surgiram apenas em 2009 (10,11,52), embora existam evidências de que o surgimento da enzima tenha ocorrido já em 2005

quando Zavascki et. al. descreveram o caso de uma *K. pneumoniae* produtora de KPC isolada em Florianópolis, Santa Catarina (53). Diversos estudos têm mostrado a disseminação de cepas produtoras de KPC por todo o território brasileiro, pois a mesma já foi identificada nas cinco regiões geográficas do país (8,9,53,54).

### **2.3.2 Alternativas no tratamento de isolados produtores de KPC**

Considerando as poucas opções clínicas para o tratamento de infecções causadas por EKPC, a PMB e a TGC constituem os principais arsenais terapêuticos disponíveis para o tratamento (55–57). As polimixinas surgiram na década de 40 e seu uso foi abandonado devido a sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade (58). O tratamento com polimixinas é associado a maior mortalidade quando comparado a outros antimicrobianos (59), além de possibilitar o recrescimento dos isolados *in vitro*, segundo alguns estudos que avaliaram sua atividade bactericida e bacteriostática (56,60–62). Entretanto, devido à emergência de bactérias resistentes à maioria dos antibióticos, as polimixinas tem se tornado uma boa opção terapêutica.

São duas as polimixinas mais utilizadas, a PMB e a Colistina (polimixina E). O espectro de ação da PMB abrange somente germes gram-negativos, onde liga-se a componentes do envelope celular como fosfolipídeos e lipopolisacarídeos (LPS) e desloca competitivamente os íons  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma e ocasionando a morte da bactéria (63). Combinadas com outros antibióticos, as polimixinas podem atuar aumentando a permeabilidade da membrana externa da parede celular bacteriana permitindo a passagem da outra droga para o interior da célula, exercendo um efeito antimicrobiano combinado e potencializado (56,64).

A TGC, uma glicilglicina derivada da minociclina, é um produto semissintético análogo às tetraciclinas e tem se mostrado ativa contra isolados resistentes às tetraciclinas e a outras classes de antibióticos (65,66). Seu mecanismo de ação é a inibição da fração 30S do ribossomo e, conseqüentemente, alterações na produção de proteínas pelas bactérias, levando a um efeito bacteriostático (67). Sua atividade não é alterada pelos mecanismos de resistência das beta-lactamases e, por esse motivo, tem constituído, juntamente com as polimixinas, uma das poucas opções terapêuticas viáveis para o tratamento de bactérias produtoras de KPC e outras carbapenemases (68,69).

Diversos estudos têm avaliado o potencial sinérgico de polimixinas, TGC e carbapenêmicos combinados entre si e/ou com outros antimicrobianos, a maior parte deles contra bacilos gram-negativos não fermentadores como *A. baumannii* (70–74).

Kádár e colaboradores (75), testaram o sinergismo de PMB e colistina com diversos antimicrobianos frente dois isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, sendo que um deles era resistente a colistina. A maioria das combinações de antibióticos demonstrou sinergismo, confirmando a superioridade da terapia combinada, mesmo em isolados com alto grau de resistência.

Outro estudo comparou a atividade de TGC isoladamente e combinada com colistina e MEM, frente isolados de EKPC. A grande maioria dos antibióticos isoladamente exerceu atividade bactericida nas primeiras horas, no entanto, após 8-16 horas houve significativo recrescimento. Por outro lado, a combinação de TGC + colistina exerceu atividade bactericida contra todos os isolados e sinérgica contra todos os isolados. A combinação de TGC + MEM não exerceu qualquer atividade sinérgica, e atividade bactericida foi demonstrada apenas contra alguns isolados (62).

Uma revisão de casos publicados sobre o tratamento de infecções causadas por EKPC, também demonstrou que as polimixinas combinadas obtêm menores taxas de falha no tratamento quando comparadas com a monoterapia. Dentre os casos tratados com combinação à base de polimixina, 71% obtiveram sucesso no tratamento, sendo que os regimes mais utilizados foram: TGC + colistina, carbapenêmicos + PMB e aminoglicosídeos + PMB. Semelhante a estes resultados, os casos tratados com carbapenêmicos em monoterapia obtiveram menor taxa de sucesso terapêutico quando comparados à terapia combinada (26% versus 60%), dos casos tratados com combinação à base de carbapenêmicos, 74% obtiveram sucesso terapêutico e os regimes mais utilizados foram: PMB + carbapenêmicos, aminoglicosídeos + carbapenêmicos e beta-lactâmicos com inibidor de beta-lactamase + carbapenêmicos (56).

Outro estudo comparando a combinação de PMB com rifampicina e IPM frente isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, demonstrou que a combinação de PMB + rifampicina apresentou atividade sinérgica em 15 dos 16 isolados, enquanto a combinação PMB + IPM foi sinérgica em 10 dos 16 isolados (76). Corroborando com estes achados, muitos estudos têm comparado a eficácia dos tratamentos com os antimicrobianos citados acima em monoterapia e sua

associação com outros antimicrobianos e, em sua grande maioria, a terapia combinada mostrou-se mais eficaz para o tratamento de infecções causadas por EKPC, demonstrando a importância de cada vez mais estudos utilizando a terapia combinada (14,56,62,75,77).

#### 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COMBINAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS - TESTE DE SINERGISMO

Até o momento não existe ensaio padronizado para a avaliação de sinergismo entre antimicrobianos *in vitro*, no entanto existem três testes que são recomendados e utilizados por órgãos internacionais e em estudos já publicados. São estes: os ensaios de *E-test*, Método de *Checkerboard* (CB) e *Time-Kill Curves* – TKC (Curvas de Tempo-Morte bacteriana) (62,64,78). O ensaio de TKC e o CB são os métodos mais utilizados para avaliar sinergismo, embora sejam mais trabalhosos e demorados. O método de *E-test* é o mais simples e rápido de ser realizado. Consiste em uma fita plástica impregnada com uma concentração fixa ou gradiente de dois ou mais antibióticos de um lado e uma escala de leitura do outro. A fita é colocada sobre a superfície de uma placa de ágar inoculada com a bactéria e incubada durante a noite. Quando há sensibilidade se forma uma zona elíptica de inibição do crescimento em torno da fita (78). Apesar da simplicidade e rapidez da técnica, o *E-test* pode subestimar os resultados (79).

O CB é um teste de microdiluição realizado em microplacas de plástico de 96 poços, que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas. A partir do índice de fração inibitória, são realizados os cálculos para avaliar se houve sinergismo, antagonismo ou indiferença (78).

O ensaio de TKC avalia a concentração do antimicrobiano e a morte da bactéria em diferentes intervalos de tempo do ensaio. O número médio de colônias (UFC/mL) obtidas com antimicrobiano isoladamente e combinado após 24 horas de crescimento é comparado com o inóculo inicial. Os resultados são expressos em log de UFC/mL. O sinergismo é definido como uma diminuição  $\geq 2\log_{10}$  na contagem total de colônias em 24 horas comparando a combinação de antibióticos com o agente mais ativo isoladamente. A atividade bactericida é definida como uma redução  $\geq 3\log_{10}$  na contagem total de UFC/mL do inóculo original e a atividade



bacteriostática é definida como manutenção ou redução  $< 3\log_{10}$  na contagem total de UFC/mL do inóculo original (80,81).

A avaliação de sinergismo torna-se uma ferramenta útil devido ao aumento expressivo de bactérias multirresistentes e ao escasso número de antibióticos disponíveis para seu manejo. Neste contexto, a terapia combinada pode consistir em uma alternativa para o tratamento destas infecções. Entretanto, como ainda não estão disponíveis estudos com grande número amostral, onde se poderia extrapolar os resultados para a clínica, indicando o regime de terapia combinada ideal para o tratamento de infecções causadas por estes microorganismos, as cepas de interesse devem ser submetidas aos testes de sinergismo e os resultados interpretados caso a caso (77).

Tängdén e colaboradores (82) avaliaram o sinergismo de dupla e tripla combinação de antibióticos contra quatro isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase pelo método de TKC. Várias combinações apresentaram efeito sinérgico, apesar da alta resistência ao aztreonam, MEM e fosfomicina de alguns isolados. Por outro lado, nenhum antibiótico foi efetivo quando testado isoladamente.

Lee e Burgess (56) realizaram TKC para DORI, colistina e PMB e suas combinações, contra quatro *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3. Todos os isolados eram resistentes a DORI e sensíveis à colistina e PMB. Todas as drogas sozinhas demonstraram rápida atividade bactericida, porém com significativo recrescimento após quatro a oito horas de incubação. Todas as combinações foram bactericidas e sinérgicas contra todos os isolados. Além disso, a combinação colistina + DORI manteve a atividade bactericida após 48 horas em dois isolados, enquanto a combinação PMB + DORI obteve este mesmo efeito em três dos quatro isolados, indicando que o efeito sinérgico pode se sobressair ao recrescimento encontrado quando os agentes foram testados isoladamente.

Le e colaboradores (83) avaliaram o sinergismo de carbapenêmicos e amicacina em quatro isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases. Todos os isolados eram resistentes a IPM, MEM, ERT e amicacina. As combinações MEM + amicacina e IPM + amicacina demonstraram atividade bactericida e sinergismo contra todos os isolados, enquanto as combinações com ERT não apresentaram qualquer atividade bactericida ou sinérgica e ainda permitiram um recrescimento bacteriano após oito horas de experimento. Todos os antibióticos sozinhos apresentaram atividade bactericida nas primeiras horas de experimento,

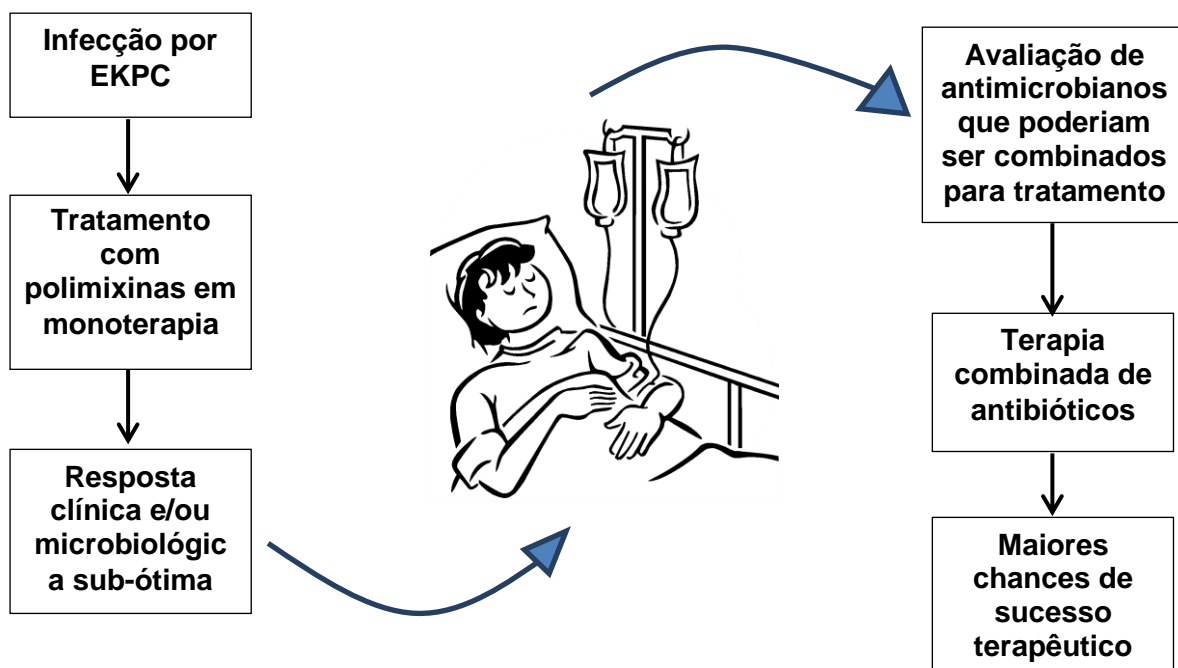
com redução de crescimento bacteriano de aproximadamente 90%, no entanto, após oito horas os isolados voltaram a crescer, o que pode ser indicativo da presença de colônias heteroresistentes.

Pournaras e colaboradores (62) realizaram TKC de TGC combinada com MEM e colistina em oito isolados de EKPC. Todos os isolados eram resistentes a MEM e sensíveis a TGC e colistina. A combinação de TGC + colistina exerceu atividade bactericida e sinérgica na maioria dos tempos e concentrações testadas contra todos os isolados, no entanto houve um moderado recrescimento de algumas cepas após 16-24 horas. Por outro lado, a combinação de TGC + MEM não exerceu atividade bactericida ou sinérgica nas quatro cepas de *K. pneumoniae* avaliadas. Quanto aos antibióticos sozinhos, o meropenem exerceu atividade bactericida contra três dos oito isolados após 24 horas. No entanto, estudos mostram que o desfecho positivo em infecções causadas por bactérias produtoras de KPC e sensíveis *in vitro* aos carbapenêmicos, quando tratadas com estes antibióticos em monoterapia é de apenas 40% (61,84). Os demais agentes quando testados isoladamente, demonstraram alguma atividade bactericida ou bacteriostática nas primeiras horas e recrescimento significativo em todos os isolados.

Diversos estudos tem encontrado uma discrepância entre os resultados da técnica de CB e da TKC, já que os dois métodos medem fenômenos diferentes. A técnica de CB baseia-se nas CIMs e reflete a inibição do crescimento das bactérias, enquanto que a metodologia de TKC mede a extensão da morte das bactérias. Em geral, o sinergismo é detectado com maior frequência pelo método TKC (78).

### 3 MARCO TEÓRICO

Figura 2 - Esquema marco teórico



Fonte: Elaborado pela autora (2014)

#### 4 JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente disseminação da enzima KPC em enterobactérias causadores de infecções nosocomiais; que as drogas mais amplamente utilizadas para o tratamento dessas infecções são as polimixinas (polimixina B, no Brasil), que a resposta terapêutica a essa classe de drogas tem sido considerada sub-ótima, e que essas drogas continuarão a ser usadas por amplo período de tempo, pois não há perspectiva de novas drogas contra bacilos gram-negativos capazes de superar a resistência mediada por carbapenemases. Um estudo que avalie a possibilidade de sinergismo desses antibióticos com outros antimicrobianos, como TGC e carbapenêmicos, frente à enterobactérias com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos e susceptibilidade diminuída ou resistência a PMB e/ou TGC, é de grande relevância na tentativa de aperfeiçoar o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de sinergismo entre a polimixina B e tigeciclina, imipenem e meropenem contra isolados de enterobactérias produtoras de KPC.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de atividade bactericida e bacteriostática em polimixina B, tigeciclina e carbapenêmicos frente enterobactérias produtoras de KPC.
- Avaliar a presença de recrescimento das enterobactérias quando tratadas com polimixina B.
- Avaliar a atividade da polimixina B sozinha e em combinação com carbapenêmicos frente isolados de *S. marcescens*, bactérias intrinsecamente resistentes a este antibiótico.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Abbott S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML and Warnock DW editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: Amer Society for Microbiology; 2011. p. 2314.
2. Stock I. Infectious diseases caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae--a particular challenge for antibacterial therapy. *Med Monatsschrift Für Pharm*. 2014 May;37(5):162–172; quiz 173–174.
3. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jun 14;
4. Siu L-KK, Huang DB, Chiang T. Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infect Dis*. 2014;14:176.
5. Bedenić B, Zujic-Atalić V, Jajić I, Djuras-Cuculić B, Godič-Torkar K, Vraneš J, et al. Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase in Croatian University Hospital. *J Chemother Florence Italy*. 2014 May 7;1973947814Y0000000191.
6. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist*. 2012;5:133–41.
7. Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Tamayo-Legorreta E, Ibarra-Pacheco A, et al. Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 May 20;
8. Fehlberg LCC, Carvalho AMC, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2012 Dec;16(6):577–80.
9. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3579–83.
10. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2702.
11. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb;63(2):265–8.

12. Zavascki AP, Machado ABMP, de Oliveira KRP, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Sep;34(3):286–8.
13. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3284–94.
14. Zavascki AP. Polymyxins for the treatment of extensively-drug-resistant Gram-negative bacteria: from pharmacokinetics to bedside. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 May;12(5):531–3.
15. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 2010. 530 p.
16. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am*. 2013 Jan;34(1):1–14.
17. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;73(4):354–60.
18. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2013 Dec;17(6):672–81.
19. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Apr;43(4):328–34.
20. Perez F, Van Duin D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med*. 2013 Apr;80(4):225–33.
21. Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan;14 Suppl 1:175–80.
22. Lyon JA. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intell Clin Pharm*. 1985 Dec;19(12):895–9.
23. Lee KS, Kang YK, Yoo KH, Kim DC, Shin KJ, Paik Y-S, et al. Novel 1 $\beta$ -methylcarbapenems with isoxazoloethenyl moieties containing carboxylic acid sodium salt. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 Jan 3;15(1):231–4.

24. Kang YK, Lee KS, Yoo KH, Shin KJ, Kim DC, Lee C-S, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1 beta-methylcarbapenems with isothiazoloethenyl side chains. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003 Feb 10;13(3):463–6.
25. Hashihayata T, Sakoh H, Goto Y, Yamada K, Morishima H. Synthesis of the side chain of a novel carbapenem via iodine-mediated oxidative cyclization of (1R)-N-(1-aryl-3-butenyl)acetamide. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2002 Mar;50(3):423–5.
26. Hashihayata T, Sakoh H, Goto Y, Hirose M, Sakuraba S, Imamura H, et al. Diastereoselective Synthesis of (2R,4R)-2-Aryl-4-hydroxypyrrolidine: Preparation of the Side Chain of Novel Carbapenem. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001;49(11):1500–2.
27. Branch CL, Burton G, Clarke GJ, Coulton S, Douglas JD, Eglinton AJ, et al. Novel C-2 substituted carbapenem derivatives. Part IV. Synthesis and biological activity of five membered heteroaromatic derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*. 1998 Feb;51(2):210–20.
28. Sunagawa M, Sasaki A, Yamaga H, Shinagawa H, Sumita Y, Nouda H. Novel quaternary ammonium carbapenems: 1 beta-methyl-2-(5'-substituted pyrrolidinylthio) carbapenems. *J Antibiot (Tokyo)*. 1994 Nov;47(11):1337–40.
29. Muratani T, Doi K, Kobayashi T, Nakamura T, Matsumoto T. [Antimicrobial activity of tebipenem against various clinical isolates from various specimen, mainly urinary tract]. *Jpn J Antibiot*. 2009 Apr;62(2):116–26.
30. Breilh D, Texier-Maugein J, Allaouchiche B, Saux M-C, Boselli E. Carbapenems. *J Chemother Florence Italy*. 2013 Feb;25(1):1–17.
31. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct;18(4):657–86.
32. Guzek A, Tomaszewski D, Rybicki Z, Truszczyński A, Barański M, Korzeniewski K. Comparison of in vitro efficacy of ertapenem, imipenem and meropenem in the infections caused by the *Enterobacteriaceae* strains family. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2013 Jun;45(2):67–72.
33. Chen P, Seth AK, Abercrombie JJ, Mustoe TA, Leung KP. Activity of imipenem against *Klebsiella pneumoniae* biofilms in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1208–13.
34. Trivedi M, Trivedi M, Patel V, Soman R, Rodriguez C, Singhal T. The outcome of treating ESBL infections with carbapenems vs. non carbapenem antimicrobials. *J Assoc Physicians India*. 2012 Aug;60:28–30.
35. Maherault A-C, Nordmann P, Therby A, Pangon B. Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012 Feb 15;54(4):577–8.
36. Ben-David D, Masarwa S, Adler A, Mishali H, Carmeli Y, Schwaber MJ. A national intervention to prevent the spread of carbapenem-resistant



- enterobacteriaceae* in israeli post-acute care hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am. 2014 Jul;35(7):802–9.
37. Qin S, Fu Y, Zhang Q, Qi H, Wen JG, Xu H, et al. High incidence and endemic spread of NDM-1 positive *Enterobacteriaceae* in Henan province, China. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Apr 28;
  38. Thibodeau E, Doron S, Iacoviello V, Schimmel J, Snyderman DR. Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*: analyzing knowledge and practice in healthcare providers. PeerJ. 2014;2:e405.
  39. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009 Apr;9(4):228–36.
  40. Szabó D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, et al. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2833–5.
  41. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1791–8.
  42. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2010 Nov 18;15(46).
  43. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol IJMM. 2013 Aug;303(6-7):298–304.
  44. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. Clin Microbiol Newsl. 2009 Apr 15;31(8):55–62.
  45. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J-P. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. BioMed Res Int. 2014;2014:305784.
  46. Almeida ACS, Cavalcanti FLS, Martins WMB, Vilela MA, Gales AC, Morais Junior MA, et al. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Aug;57(8):4077–8.
  47. Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC, et al. Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov;67(11):2776–7.
  48. Jácome PRL de A, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Sep;56(9):4990.

49. Almeida ACS, Vilela MA, Cavalcanti FLS, Martins WMBS, Morais MA, Morais MMC. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2205–6.
50. Jacoby G, Bush K.  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. <http://www.lahey.org/studies/> [Internet]. [cited 2014 Nov 24]; Available from: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>
51. Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, on behalf of ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun 16;
52. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):333–4.
53. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado ABMP, de Oliveira KRP, Superti SV, Pilger DA, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2010 Jun;14(6):e539–540.
54. Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari ACC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(kpc) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Feb;46(1):114–5.
55. Clancy CJ, Hao B, Shields RK, Chen L, Perlin DS, Kreiswirth BN, et al. Doripenem, Gentamicin, and Colistin, Alone and in Combinations, against Gentamicin-Susceptible, KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains with Various ompK36 Genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jun;58(6):3521–5.
56. Lee GC, Burgess DS. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res*. 2013 Apr;5(2):97–100.
57. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):895–904.
58. Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Feb;39(2):255–60.
59. Paul M, Bishara J, Levcovich A, Chowders M, Goldberg E, Singer P, et al. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2010 May;65(5):1019–27.
60. Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL. In vitro pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-

- resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):874–9.
61. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Jun;65(6):1119–25.
  62. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar;37(3):244–7.
  63. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol*. 2013 Jun;8(6):711–24.
  64. Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Aug;70(4):561–4.
  65. Peterson LR. A review of tigecycline--the first glycolcycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Dec;32 Suppl 4:S215–222.
  66. Kasbekar N. Tigecycline: a new glycolcycline antimicrobial agent. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm*. 2006 Jul 1;63(13):1235–43.
  67. Da Silva LM, Nunes Salgado HR. Tigecycline: a review of properties, applications, and analytical methods. *Ther Drug Monit*. 2010 Jun;32(3):282–8.
  68. Betts JW, Phee LM, Hornsey M, Woodford N, Wareham DW. In Vitro and In Vivo Activities of Tigecycline-Colistin Combination Therapies against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jun;58(6):3541–6.
  69. Van Duin D, Cober E, Richter SS, Perez F, Cline M, Kaye KS, et al. Tigecycline Therapy for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) Bacteriuria Leads to Tigecycline Resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun 1;n/a–n/a.
  70. Liang W, Liu X-F, Huang J, Zhu D-M, Li J, Zhang J. Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 2011;11:109.
  71. Lim T-P, Tan T-Y, Lee W, Sasikala S, Tan T-T, Hsu L-Y, et al. In-vitro activity of polymyxin B, rifampicin, tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *PloS One*. 2011;6(4):e18485.
  72. Tan TY, Lim TP, Lee WHL, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL-H. In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of

- testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jan;55(1):436–8.
73. Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest and time-kill assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Feb;63(2):228–32.
74. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):753–7.
75. Kádár B, Kocsis B, Tóth Á, Damjanova I, Szász M, Kristóf K, et al. Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013 Jun;60(2):201–9.
76. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):128–32.
77. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Dec;11(12):1333–53.
78. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Aug;40(8):1914–8.
79. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jul;69(7):1856–65.
80. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Barry PDAL, Craig MDWA, Nadler PDH, Reller MDLB, Sanders PDCC, et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. First edition. Wayne, PA; 1999.
81. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* American Society for Microbiology; 1992. book p.
82. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Mar;58(3):1757–62.
83. Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* 2011 May 19;3(3):106–10.

84. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Jun;64(2):233–5.

## 7 MANUSCRITO

Submetido à revista *Journal of Medical Microbiology*

***In vitro* activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem and tigecycline against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* isolates**

Running title: Polymyxin B combinations with carbapenems and tigecycline in Enterobacteriaceae

**Natália Barth<sup>1,2</sup>, Vanessa BleyRibeiro<sup>1,3\*</sup>, Alexandre Prehn Zavascki<sup>1,2,4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Campus Uruguaiana, Uruguaiana, Brazil.

<sup>4</sup>Infectious Diseases Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90.035-903, Brazil. Phone+55 51 3359 8607

E-mail address: [vanebley@hotmail.com](mailto:vanebley@hotmail.com)

## ABSTRACT

The combination therapy has shown more effective results compared to monotherapies against KPC-producing bacteria due to the unfavorable profile of sensitivity of these organisms. Polymyxins are usually the cornerstone agents used in combination with carbapenems or tigecycline (TGC) for treatment of these infections due to KPC-producing isolates. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of polymyxin B (PMB) in combination with imipenem (IPM), meropenem (MEM), and TGC against three distinct species of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* isolates by the time-kill assay. Carbapenems and TGC were tested at fixed concentration of 4 and 1 µg/mL, respectively, and PMB was tested at concentrations of 0.5, 1 and 2 µg/mL. When tested as single drugs, the better result was observed with PMB that achieved a bacteriostatic effect against two isolates. IPM, MEM and TGC did not present bacteriostatic or bactericidal effect. The combinations of PMB with carbapenems presented bactericidal effect against one *E. cloacae* and one *K. pneumoniae*, whereas for *S. marcescens* only a bacteriostatic effect was observed when MEM was used. Although combinations with carbapenems were superior, considering a higher reduction in the colony count, PMB plus TGC also showed a bactericidal effect among *E. cloacae* and *K. pneumoniae*. Synergism was detected for all isolates studied, at least, when the higher concentration of PMB was used in combination schemes. In summary, our results showed promising results when PMB was combined to carbapenems against highly resistant KPC-2-producing isolates.

Keywords: multiresistance, polymyxin B, carbapenems, *Enterobacteriaceae*, *S. marcescens*.

## INTRODUCTION

Carbapenem-resistant KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* isolates have emerged as a major cause of hospital-acquired infections worldwide and have severely challenged the antimicrobial therapy (Andrade *et al.*, 2011; Babouee *et al.*, 2011). Some preclinical data and clinical studies have demonstrated that combination therapy may be superior to monotherapy, particularly with polymyxins, which are usually the cornerstone agents in combination schemes for treatment of these infections (Zavascki *et al.*, 2013). Owing to its *in vitro* susceptibility profile, tigecycline (TGC) has been one of the most common antimicrobial used in combination with polymyxins (Betts *et al.*, 2014). Additionally, even carbapenems have been used in combination schemes, some studies suggesting that they might be the drug of choice for combination, notably if isolates presents low-level resistance to these agents (Clancy *et al.*, 2014). However, their role in combination schemes when high-level resistance is observed warrants further evaluation.

Notably, the major therapeutic challenges occur when at least one of the following conditions are observed in KPC-2-producing isolates: high-level resistance to carbapenems and decreased susceptibility or resistance to polymyxins and/or TGC. Thus, in order to provide some additional support to therapeutic decisions, this study aimed to evaluate the *in vitro* activity of polymyxin B (PMB) in combination with meropenem (MEM), imipenem (IPM) and TGC against three distinct species of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* isolates showing at least one of the unfavorable characteristics mentioned above.



## METHODS

### Bacterial isolates

Isolates comprised six KPC-2-producing clinical strains, including two *Klebsiella pneumoniae*, two *Enterobacter cloacae*, and two *Serratia marcescens*. These isolates have been fully characterized as KPC-2-producing by gene sequencing and each isolate from distinct species belonging to unrelated clones by PFGE analysis (Ribeiro *et al.*, 2013). MICs for carbapenems, PMB and TGC were performed by broth microdilution. The cutoff for carbapenems (R > 4 for both) were interpreted according to CLSI (CLSI, 2013) and cutoff for PMB and TGC (R >2 for both) were interpreted according to EUCAST (EUCAST, 2013) (Table 1).

### Time–kill assay (TKA)

TKA was performed by inoculating  $5 \times 10^6$  colony-forming units (CFU)/mL of the organisms into 10mL of fresh cation-adjusted Mueller–Hinton broth (Oxoid). PMB at concentrations of 0.5, 1 and 2µg/mL was used in combination at a fixed concentration of 4µg/mL for IPM, MEM and 1µg/mL for TGC. These concentrations were chosen considering free drug levels achieved in serum administering high dose regimes (Zavascki *et al.*, 2013). Aliquots were removed at 0; 0.25; 1; 2; 4; 8; 12 and 24 hours after inoculation and incubation at 35°C, and plated on blood agar (Biomerieux) for colony count.

Time kill curves (TKC) were constructed by plotting the colony counts in CFU/mL versus time. The results were interpreted as follow: bactericidal activity

means a  $\geq 3 \log_{10}$  reduction in the total count CFU/mL from the original inoculum; bacteriostatic activity means the maintenance of or  $< 3 \log_{10}$  reduction in the total count CFU/mL from the original inoculum; and synergism means as  $\geq 2 \log_{10}$  decrease in the number of CFU/mL between the combination and the most active agent after 24 hours of incubation.

## RESULTS

The  $\log_{10}$  CFU/mL changes from the initial bacterial concentrations with the antibiotics tested as single agents and in combinations during the TKA are presented in Table 2. All TKC are presented in supplementary material.

PMB alone showed a distinct profile according to the isolate: a bactericidal effect (reduction  $\geq 3 \log_{10}$  CFU/mL) was observed only from the first to fourth hour after incubation for *K. pneumoniae* and *E. cloacae* isolates, with further regrowth. After 24 hours, only two isolates (118HC and 144PRO) presented a bacteriostatic effect at the three concentrations tested of PMB. On the other hand, for *S. marcescens* isolates, regardless the concentration, PMB alone was not able to reduce the bacterial growth (Table 2). IPM, MEM and TGC did not present bacteriostatic or bactericidal effect when tested as single drug against all KPC-2-producing isolates (Table 2).

The combinations of PMB with carbapenems IPM and MEM presented bactericidal effect against all *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates. For *S. marcescens*, a bacteriostatic effect was demonstrated against the 79PRO strain. (Table 2). On the other hand, the combinations PMB/IPM and PMB/MEM achieved a synergistic activity for all KPC-2-producing isolates (Table 2).

For combinations of PMB and TGC, a bactericidal effect was observed among *E. cloacae* and *K. pneumoniae* (except to 5HC strain). None bactericidal or bacteriostatic effect was demonstrated against the two isolates of *S. marcescens*. Synergism was detected in all strains studied, at least, when the higher concentration of PMB was used (Table 2).

## DISCUSSION

In this study we evaluated nine antibiotic combinations with PMB against six KPC-2-producing-*Enterobacteriaceae* with “unfavorable” antibiotic susceptible profile, i.e. decreased susceptibility or resistance to PMB and/or TGC and high-level resistance to IPM and MEM (MIC > 8 µg/ml).

PMB apparently presented a higher activity compared to the other drugs when tested alone. However, the bactericidal effect observed for most of isolates in the first hours of incubation (mainly up to eight hours), was latter replaced by a considerable regrowth. This characteristic is consistent with previous static pharmacodynamics studies (Hagihara *et al.*, 2014; Lee & Burgess, 2013; Hirsch & Tam, 2010). Only for strains 118HC and 144PRO the PMB was not able to reduce > 3 log<sub>10</sub> CFU/mL count from the original inoculum, resulting in a bacteriostatic effect.

IPM and MEM as single agents did not inhibit the growth of any KPC-2-producing *Enterobacteriaceae*, as expected due to the high MICs. Tzouveleki *et al.* (2012) reported the occurrence of therapeutic failure when carbapenems are used as monotherapy to treat infections caused by KPC producers. Although 67% of isolates were susceptible to TGC, neither a bactericidal nor a bacteriostatic effect was observed against the isolates tested when TGC was used alone. Similar results were

found against VIM-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates (Hagihara *et al.*, 2014; Tängdén *et al.*, 2014). Due to this variable pattern, double or triple antibiotic combinations have been proposed by many authors in order to avoid therapeutic failure (Karaoglan *et al.*, 2013; Michail *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2013).

The combinations of PMB with carbapenems were the most effective regimen for KPC-2-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates, revealing a bactericidal effect with a null colony count in five of the six combinations tested for these species. Although combinations with TGC also showed a bactericidal effect, the reduction on colony count was not so extend when compared to carbapenems use. A low inhibitory activity was observed against to *S. marcescens* strains, possibly due to the high carbapenems MICs and PMB intrinsically resistance. A bacteriostatic action achieved for 79PRO isolate in all PMB/ MEM combinations. An equivalent result observed for combination with IPM just when PMB used at the higher concentration (2µg/mL). Combinations with TGC were the less effective, although a synergic result achieved for both strains.

The combinations of PMB with carbapenems and TGC, in general, have also shown a beneficial association. *in vitro* efficacy of these combinations had already been reported in several studies (Lee & Burgess, 2013; Pankey & Ashcraft, 2011; Bratu *et al.*, 2005). On the other hand, a low efficacy of combinations with TGC against multiresistant *Enterobacteriaceae* has also been reported (Betts *et al.*, 2014).

In summary, our results showed promising results when PMB was combined mainly to carbapenems against *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates. It was also demonstrated a potential benefic effect in combining these antibiotics against highly resistant KPC-2-producing *S. marcescens* isolates.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Process no. 10/0026-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERENCES

- Andrade, L. N., Curiao, T., Ferreira, J. C., Longo, J. M., Clímaco, E. C., Martinez, R., Bellissimo-Rodrigues, F., Basile-Filho, A., Evaristo, M. A. & other authors. (2011). Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3579–3583.
- Babouee, B., Widmer, A. F., Dubuis, O., Ciardo, D., Droz, S., Betsch, B. Y., Garzoni, C., Führer, U., Battegay, M. & other authors. (2011). Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 16.
- Betts, J. W., Phee, L. M., Hornsey, M., Woodford, N. & Wareham, D. W. (2014). In Vitro and In Vivo Activities of Tigecycline-Colistin Combination Therapies against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 3541–3546.
- Bratu, S., Tolaney, P., Karumudi, U., Quale, J., Mooty, M., Nichani, S. & Landman, D. (2005). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 56, 128–132.
- Clancy, C. J., Hao, B., Shields, R. K., Chen, L., Perlin, D. S., Kreiswirth, B. N. & Nguyen, M. H. (2014). Doripenem, Gentamicin, and Colistin, Alone and in Combinations, against Gentamicin-Susceptible, KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains with Various ompK36 Genotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 3521–3525.
- CLSI. (2013). Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing. 23rd Informational Supplement, Waine, PA.
- EUCAST. (2013). Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. <http://www.eucast.org>.
- Hagihara, M., Housman, S. T., Nicolau, D. P. & Kuti, J. L. (2014). In vitro pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 874–879.
- Hirsch, E. B. & Tam, V. H. (2010). Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 65, 1119–1125.
- Karaoglan, I., Zer, Y., Bosnak, V. K., Mete, A. O. & Namiduru, M. (2013). In vitro synergistic activity of colistin with tigecycline or  $\beta$ -lactam antibiotic/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Int Med Res* 41, 1830–1837.

- Lee, G. C. & Burgess, D. S. (2013). Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res* 5, 97–100.
- Michail, G., Labrou, M., Pitiriga, V., Manousaka, S., Sakellaridis, N., Tsakris, A. & Pournaras, S. (2013). Activity of Tigecycline in combination with Colistin, Meropenem, Rifampin, or Gentamicin against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 6028–6033.
- Netto, B., Vieira, B. J., Hermes, D. M., Ribeiro, V. B. & Zavascki, A. P. (2013). In vitro activity of non-bactericidal concentrations of polymyxin B in combination with other antimicrobials against OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis* 17, 502–504.
- Pankey, G. A. & Ashcraft, D. S. (2011). Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70, 561–564.
- Ribeiro, V. B., Andrade, L. N., Linhares, A. R., Barin, J., Darini, A. L. da C., Zavascki, A. P. & Barth, A. L. (2013). Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol* 62, 1721–1727.
- Tängdén, T., Hickman, R. A., Forsberg, P., Lagerbäck, P., Giske, C. G. & Cars, O. (2014). Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1757–1762.
- Tzouveleki, L. S., Markogiannakis, A., Psichogiou, M., Tassios, P. T. & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25, 682–707.
- Zavascki, A. P., Bulitta, J. B. & Landersdorfer, C. B. (2013). Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11, 1333–1353.

**Table 1.** Minimum inhibitory concentrations of KPC-2 producing isolates

Isolates	Minimum Inhibitory concentration (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	IPM <sup>a</sup>	MEM <sup>a</sup>	TGC <sup>b</sup>	PMB <sup>a</sup>
EC 5HC	64	128	1	2
EC 118HC	64	32	1	2
KP 134PRO	32	32	4	2
KP 144PRO	8	32	1	2
SM 79PRO	128	32	1	64
SM 151PRO	256	64	4	>64

EC, *E. cloacae*; KP, *K. pneumoniae*; SM, *S. marcescens*; IPM, imipenem; MEM, meropenem; PMB, polymyxin B; TGC, tigecycline.

<sup>a</sup> Interpreted according CLSI breakpoints (2013)

<sup>b</sup> Interpreted according to EUCAST breakpoints (2013).



**Table 2.** killing activity of IPM, MEM, TGC and PMB alone and Log  $\Delta$  of combinations after 24 hours of incubation.

Antimicrobialagent/ combination	EC 5HC	EC 118HC	KP 134PRO	KP 144PRO	SM 79PRO	SM 151PRO
	Killing activity <sup>a</sup>					
PMB						
0.5	4,90	- 2,45	3,89	- 1,99	3,90	6,07
1	3,44	- 2,91	3,81	- 2,09	3,84	6,04
2	2,92	- 2,15	2,50	- 2,49	3,47	6,01
IPM 4	4,54	5,39	3,33	5,39	6,40	8,84
MEM 4	4,79	4,80	4,92	4,58	6,53	8,35
TGC 1	2,67	2,72	3,33	3,10	2,46	3,53
PMB + IPM						
	Log $\Delta$ <sup>b</sup>					
0.5	<b>- 6,47</b>	<b>- 4,74</b>	<b>- 5,24</b>	<b>- 4,70</b>	<b>- 2,88</b>	<b>- 2,51</b>
1	<b>- 9,80</b>	<b>- 5,64</b>	<b>- 9,17</b>	<b>- 4,60</b>	<b>- 3,26</b>	<b>- 2,62</b>
2	<b>- 9,62</b>	<b>- 4,54</b>	<b>- 7,81</b>	<b>- 4,20</b>	<b>- 3,39</b>	<b>- 2,65</b>
PMB + MEM						
0.5	<b>- 11,60</b>	<b>- 4,24</b>	<b>- 3,47</b>	<b>- 5,17</b>	<b>- 4,98</b>	<b>- 3,55</b>
1	<b>- 10,14</b>	<b>- 3,78</b>	<b>- 8,38</b>	<b>- 5,08</b>	<b>- 5,78</b>	<b>- 3,58</b>
2	<b>- 3,07</b>	<b>- 5,62</b>	<b>- 8,14</b>	<b>- 4,87</b>	<b>- 7,93</b>	<b>- 3,77</b>
PMB + TGC						
0.5	- 1,20	- 0,94	<b>- 5,78</b>	<b>- 4,69</b>	<b>- 2,90</b>	- 1,04
1	- 1,32	<b>- 2,20</b>	<b>- 6,48</b>	<b>- 4,60</b>	<b>- 2,97</b>	- 1,18
2	<b>- 2,71</b>	<b>- 4,54</b>	<b>- 6,57</b>	<b>- 4,20</b>	<b>- 3,07</b>	<b>- 2,51</b>

EC, *E. cloacae*; KP, *K. pneumoniae*; SM, *S. marcescens*; PMB, polymyxin B; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TGC, tigecycline; CFU, colony-forming units.

<sup>a</sup> Killing activity was defined as the difference between the log<sub>10</sub> concentration of isolates after 24 h of incubation with drug(s) and the log<sub>10</sub> of initial inoculum (approximately 5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Positive numbers denote growth of strains compared with initial inoculum.

<sup>b</sup> Log  $\Delta$  (Final inoculum of the combined drugs – Final inoculum of the most active drug in combination [log<sub>10</sub> CFU/mL]). Synergy highlighted in bold was defined as a  $\geq 2$  log<sub>10</sub> decrease in colony count after 24 h by the combination compared with the most active single agent.

Bactericidal activity was defined as a  $\geq 3$  log<sub>10</sub> decrease in colony count after 24.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enterobactérias constituem os patógenos mais importantes envolvidos em infecções nosocomiais, e o aumento da resistência à maioria dos antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, tem se tornado um problema de saúde pública global (1). Considerando que a KPC atualmente representa um dos maiores desafios frente a escolha dos antimicrobianos, a terapia combinada tem sido considerada uma opção a fim de melhorar a eficácia no tratamento de infecções causadas por EKPC (77).

IPM, MEM e TGC não apresentaram efeito bacteriostático ou bactericida quando testados como única droga contra todos os isolados (Anexo A, pág. 51). Por outro lado, todas as combinações de antibióticos mostraram sinergismo com atividade bactericida ou, pelo menos, um efeito bacteriostático para todos os isolados testados, sendo as combinações mais efetivas aquelas com PMB 1,0 e 2,0 µg/mL combinada aos carbapenêmicos. Apesar de os isolados de SM terem apresentado CIMs elevadas para PMB, para ambas as cepas houve sinergismo quando a PMB foi combinada a IPM e MEM. Embora a associação de PMB com TGC tenha sido menos eficaz, ainda assim foi demonstrada atividade sinérgica, bactericida e/ou bacteriostática, pelo menos quando usada a maior concentração de PMB (Anexo B, pág. 54). Nossos resultados confirmam a superioridade das combinações de antimicrobianos em comparação às monoterapias e sugerem que, a PMB combinada com carbapenêmicos ou TCG pode ser uma opção terapêutica eficaz para o tratamento de infecções causadas por isolados produtores de KPC.

Embora nosso estudo tenha a limitação de ter sido realizado apenas contra seis isolados, sendo dois de cada espécie, o mesmo pode vir a contribuir no manejo de infecções causadas por EKPC. É importante que tanto estudos tanto clínicos quanto *in vitro* sejam realizados a fim de se ter mais dados sobre a eficácia da combinação destes antimicrobianos em infecções bacterianas.

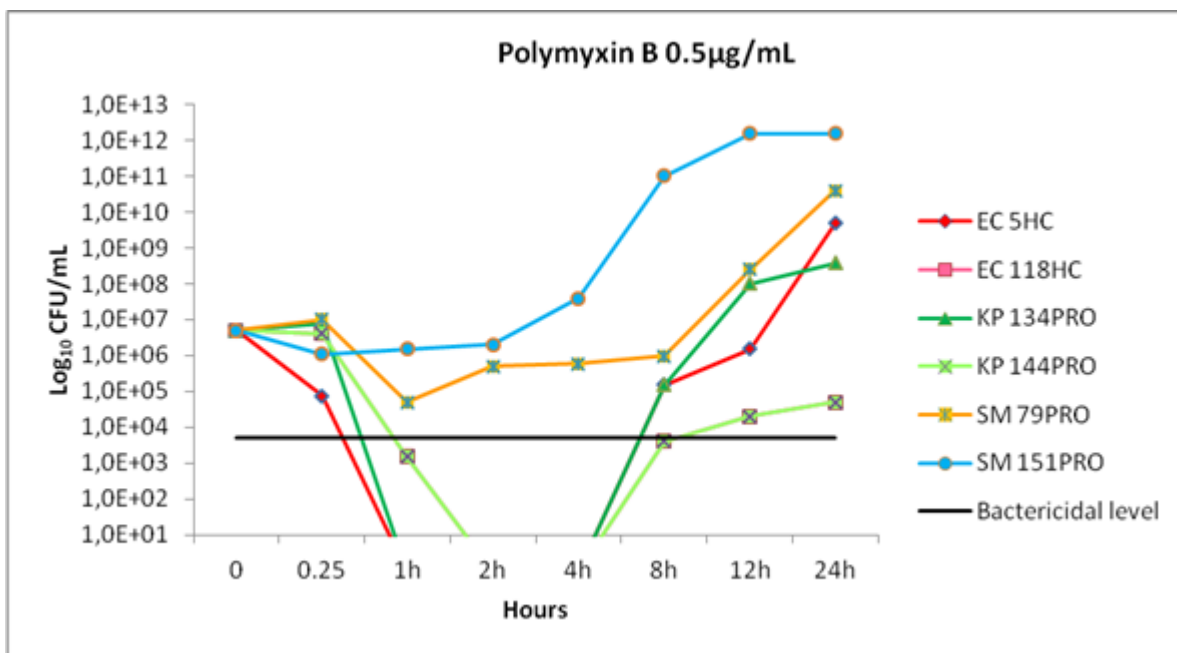
## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectiva futura, pretende-se avaliar a combinação de PMB com outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos e cefalosporinas, além de aumentar o número de cepas testadas, a fim de se obter um painel de drogas com maior eficácia para uso na terapia combinada no tratamento de infecções causadas por EKPC.

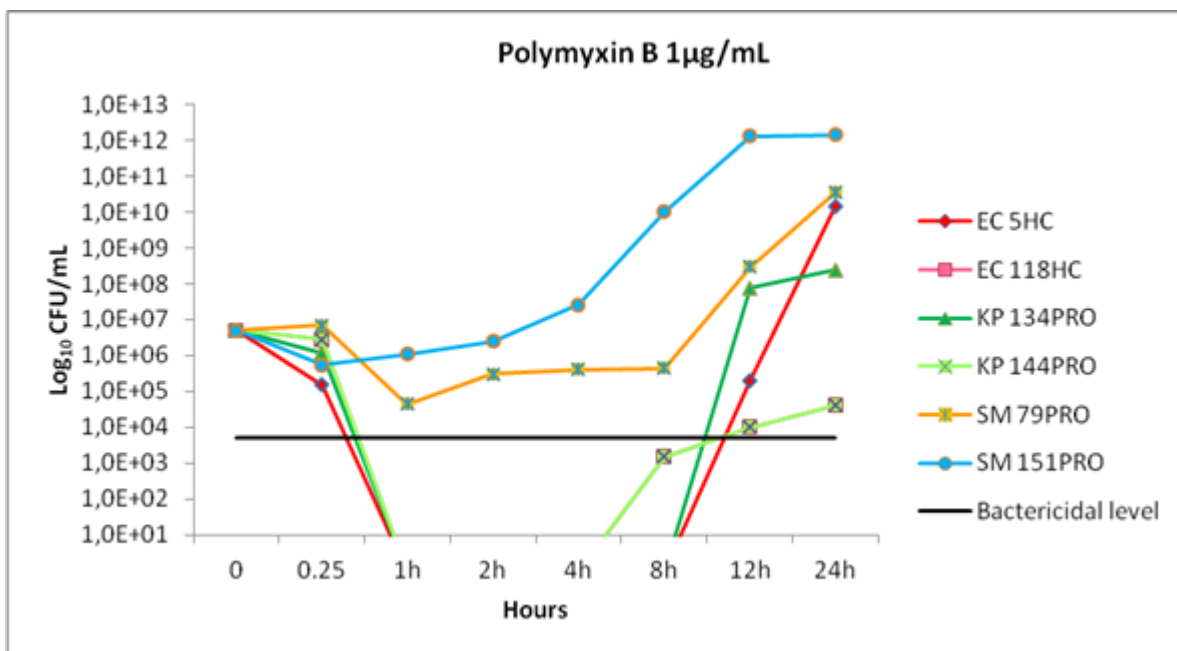
## 10 ANEXOS

## ANEXO A - TKC dos antibióticos sozinhos

TKC de PMB 0,5 µg/mL nos seis isolados testados

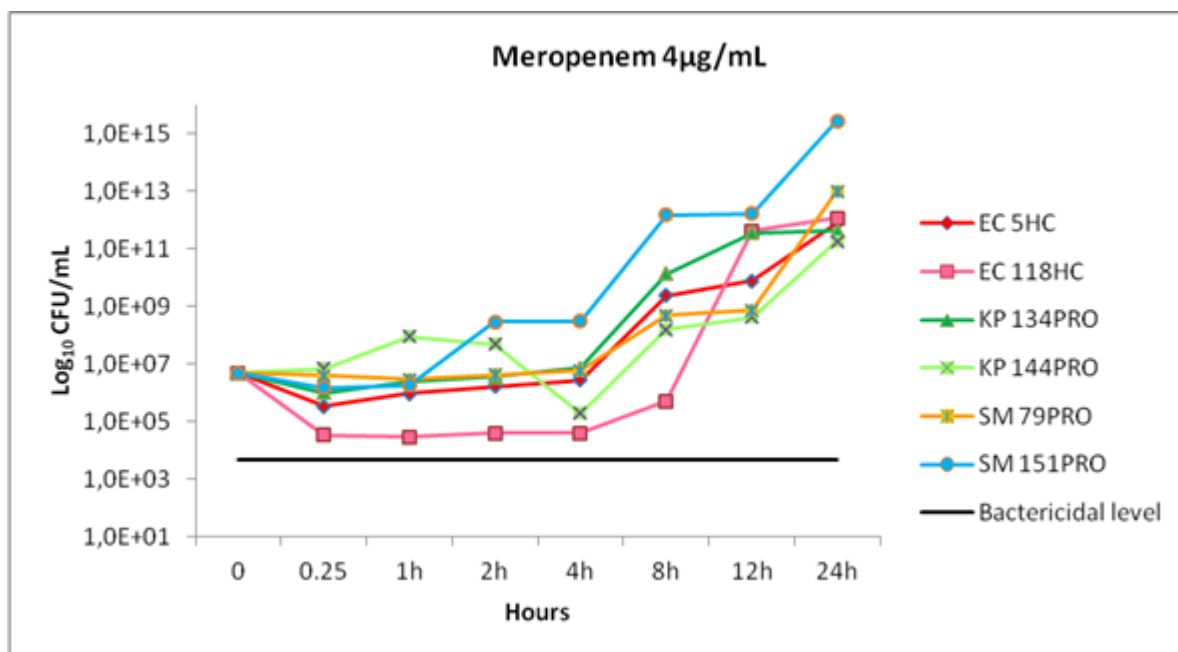


TKC de PMB 1,0 µg/mL nos seis isolados testados

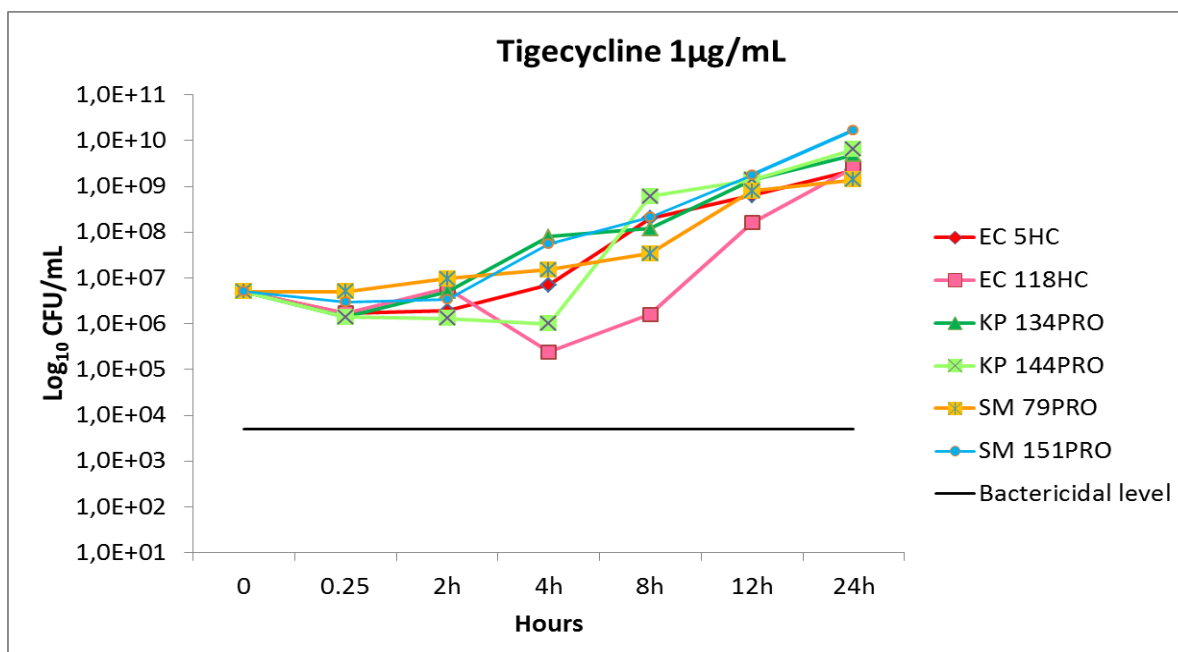




TKC de MEM 4,0 µg/mL nos seis isolados testados



TKC de TGC 1,0 µg/mL nos seis isolados testados

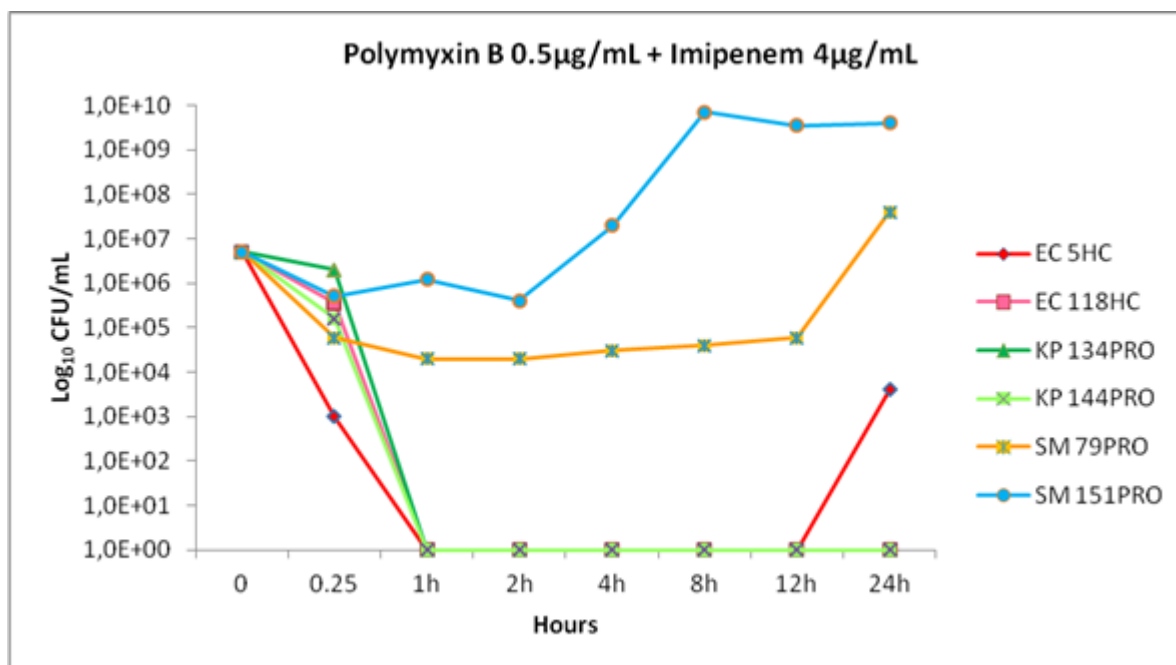


EC, *E. cloacae*; KP, *K. pneumoniae*; SM, *S. marcescens*; PMB, polimixina B; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TGC, tigeciclina; CFU, unidades formadoras de colônia.

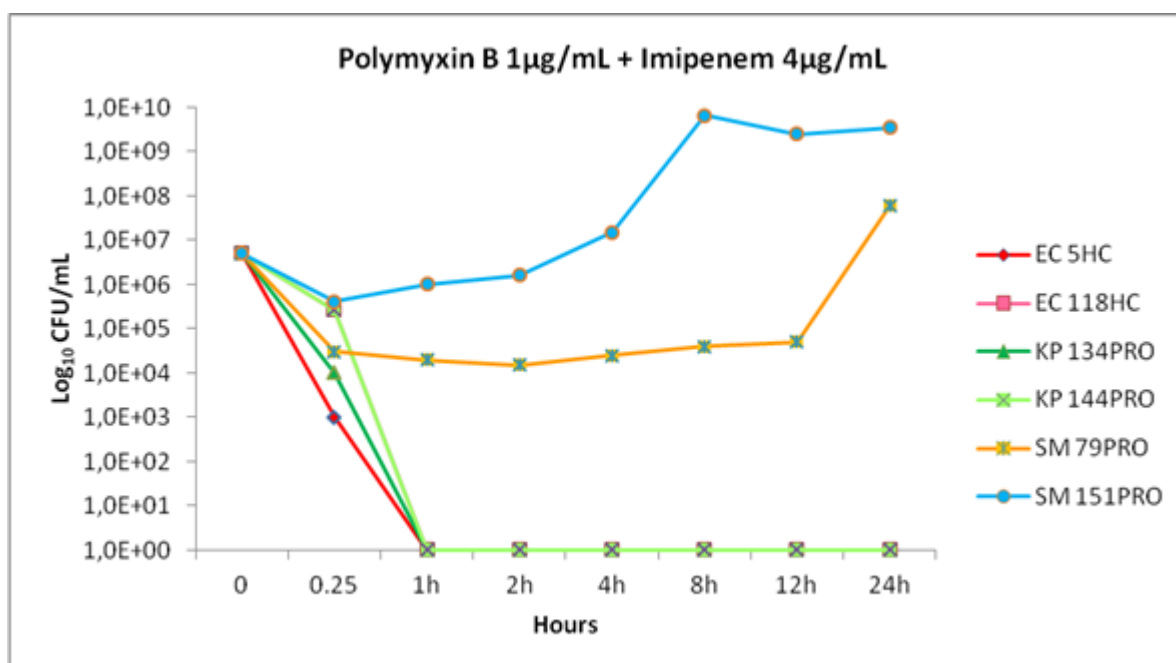
As alterações médias no crescimento bacteriano após 24 horas de incubação, em comparação com o crescimento inicial foram medidos em  $\log_{10}$  UFC/mL.

## ANEXO B – TKC das combinações de antibióticos

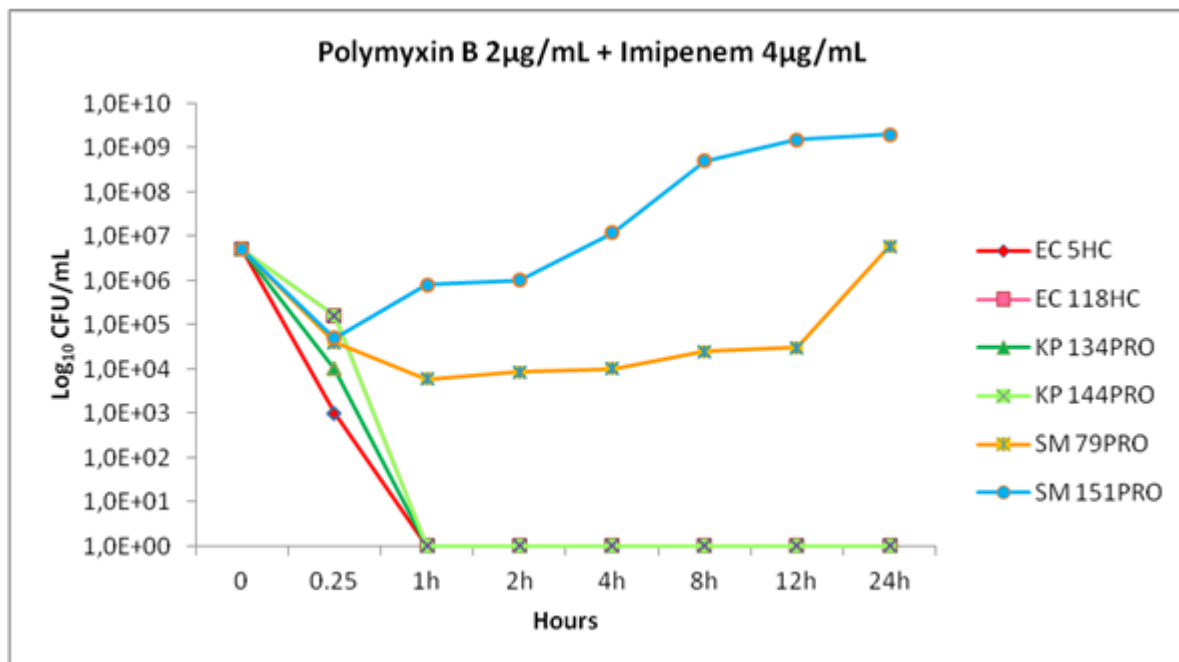
TKC de PMB 0,5µg/mL + IPM 4µg/mL nos seis isolados testados



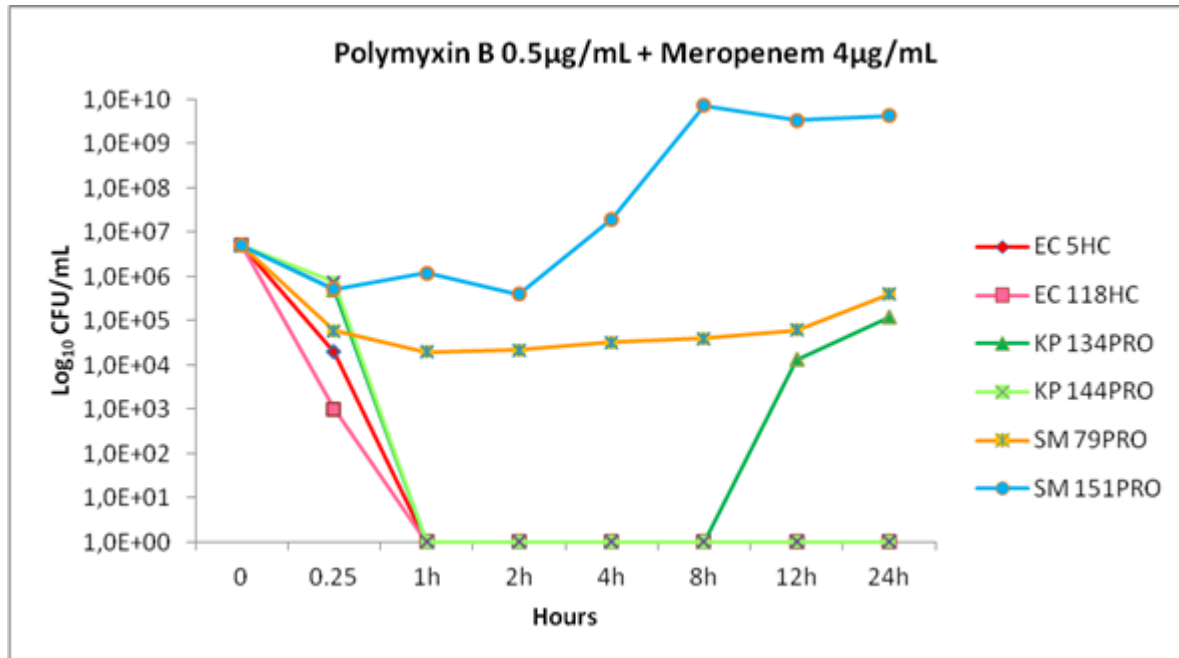
TKC de PMB 1,0µg/mL + IPM 4µg/mL nos seis isolados testados



TKC de PMB 2,0µg/mL + IPM 4µg/mL nos seis isolados testados

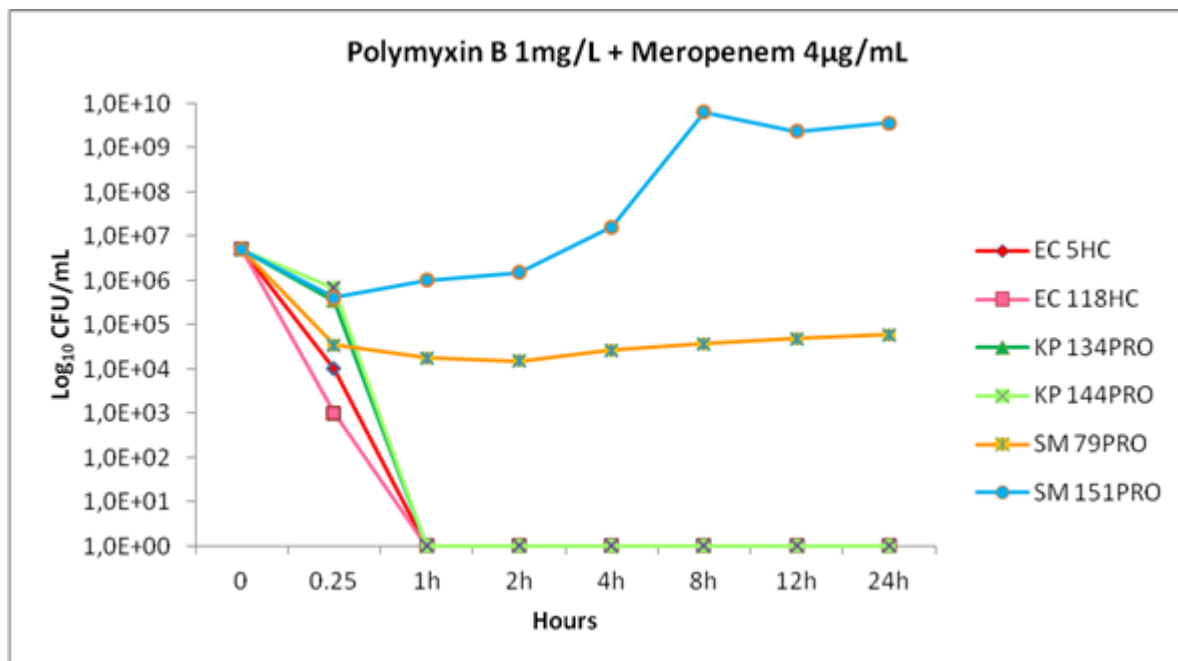


TKC de PMB 0,5µg/mL + MEM 4µg/mL nos seis isolados testados

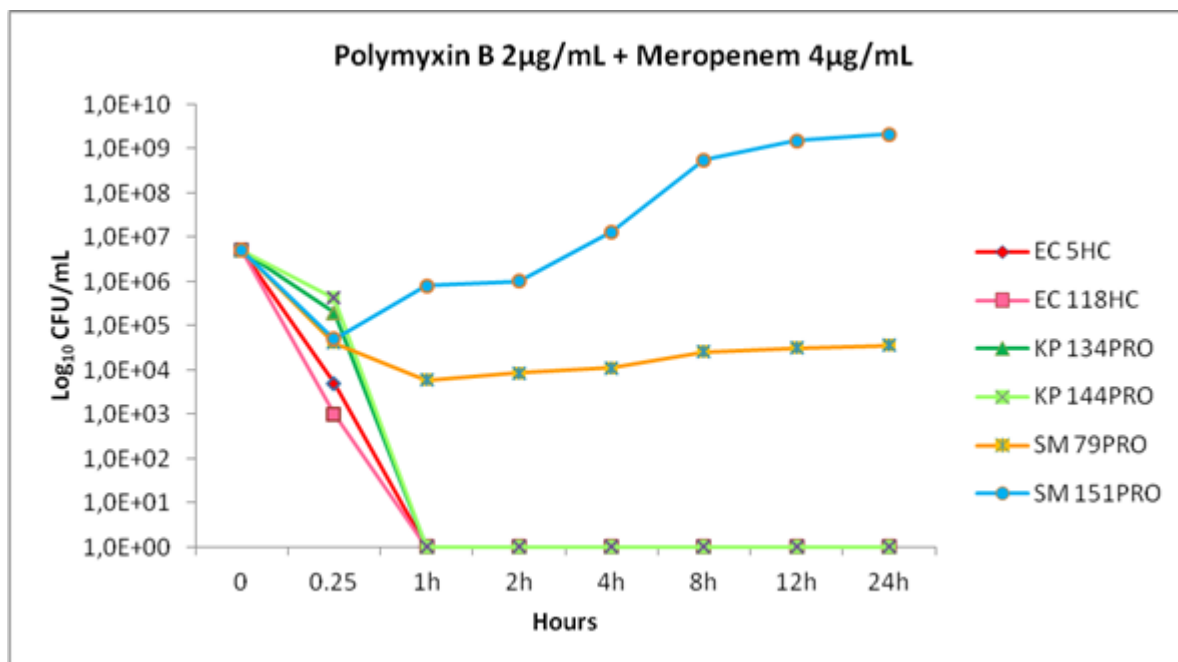




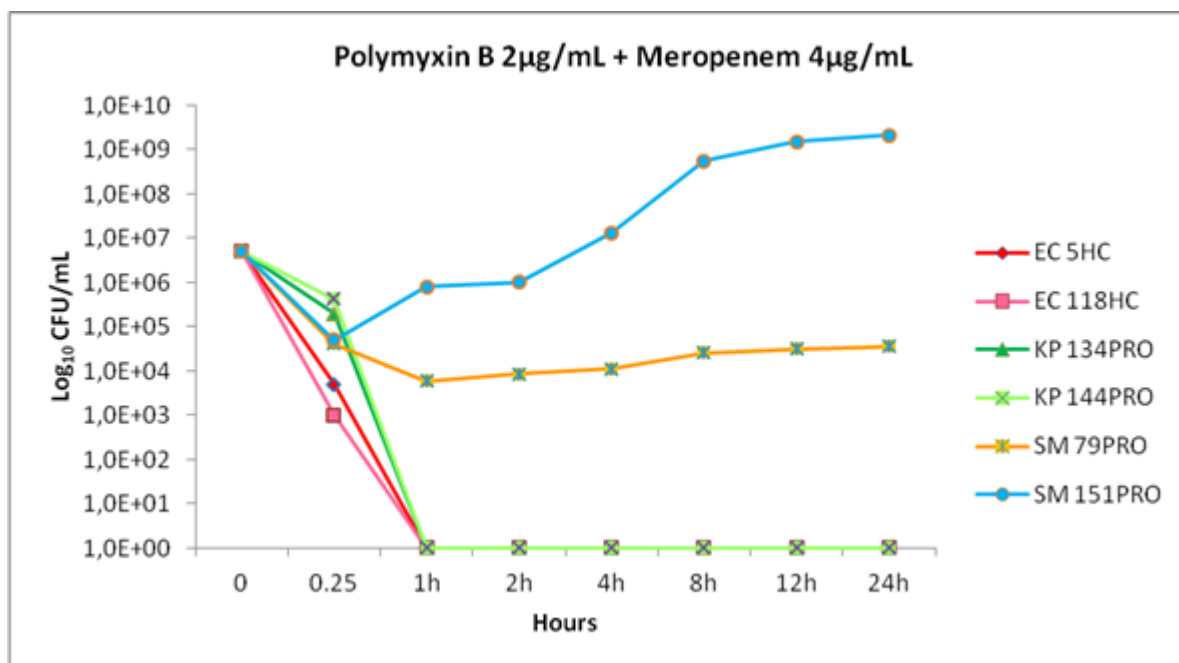
TKC de PMB 1,0µg/mL + MEM 4µg/mL nos seis isolados testados



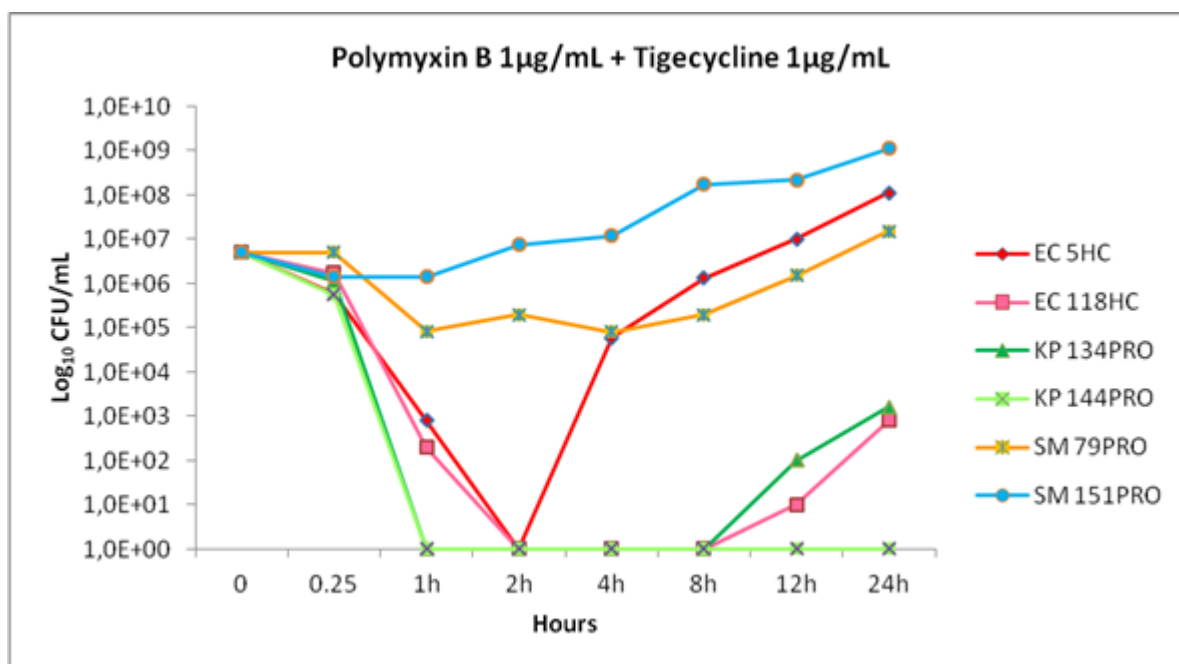
TKC de PMB 2,0µg/mL + MEM 4µg/mL nos seis isolados testados



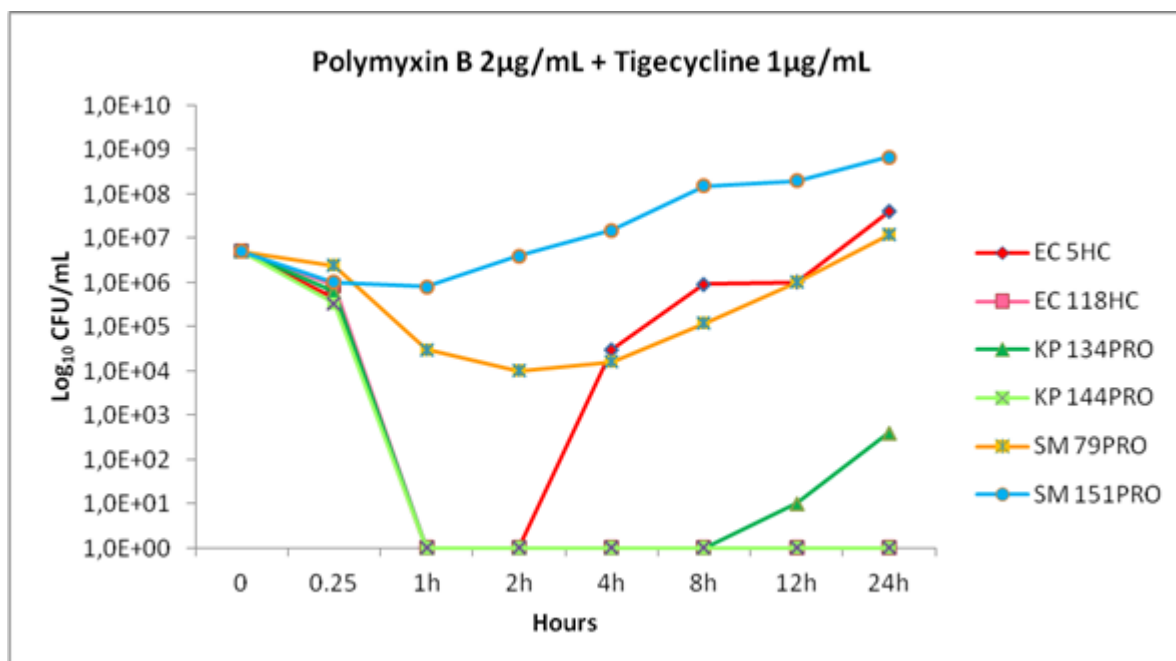
TKC de PMB 0,5µg/mL + TGC 1µg/mL nos seis isolados testados



TKC de PMB 1,0µg/mL + TGC 1µg/mL nos seis isolados testados



TKC de PMB 2,0µg/mL + TGC 1µg/mL nos seis isolados testados



EC, *E. cloacae*; KP, *K. pneumoniae*; SM, *S. marcescens*; PMB, polimixina B; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TGC, tigeciclina; CFU, unidade formadora de colônia.

As alterações médias no crescimento bacteriano após 24 horas de incubação, em comparação com o crescimento inicial foram medidos em  $\log_{10}$  UFC/mL.