

PAULA VIRGINIA MICHELON TOLEDO

**AVALIAÇÃO DE MONOTERAPIAS E ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS
PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO POTENCIALMENTE LETAL POR *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE EM MODELO
EXPERIMENTAL**

**CURITIBA
2017**

PAULA VIRGINIA MICHELON TOLEDO

**AVALIAÇÃO DE MONOTERAPIAS E ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS
PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO POTENCIALMENTE LETAL POR *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Co-orientador: Dr. Ayrton Alves Aranha Junior

**CURITIBA
2017**

Toledo, Paula Virginia Michelin

Avaliação de monoterapias e associações de antimicrobianos para tratamento de infecção potencialmente letal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase em modelo experimental / Paula Virginia Michelin Toledo; Orientador: Felipe Francisco Tuon. Curitiba (PR), 2017.

XXX f. : il.

Orientador: Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Co-orientador: Dr. Ayrton Alves Aranha Junior

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências da Saúde, Curitiba, 2017.

1.carbapenemase. 2. KPC. 3.associação de antimicrobianos.
4.modelo experimental. 5.tigeciclina. 6.polimixina. 7.meropenem I. Título.



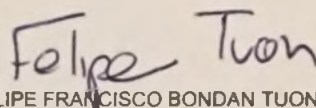
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA

TERMO DE APROVAÇÃO

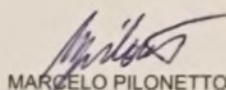
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PAULA VIRGINIA MICHELON TOLEDO** intitulada: "AVALIAÇÃO DE MONOTERAPIAS E ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO POTENCIALMENTE LETAL POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE EM MODELO EXPERIMENTAL", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

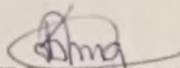
Curitiba, 23 de Agosto de 2017.



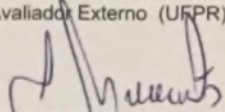
FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



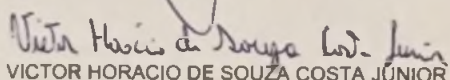
MARCELO PILONETTO
Avaliador Externo (PUC/PR)



KEITE DA SILVA NOGUEIRA
Avaliador Externo (UFPR)



CESAR ROBERTO BUSATO
Avaliador Externo (UEPG)



VICTOR HORACIO DE SOUZA COSTA JÚNIOR
Avaliador Externo (PUC/PR)

Ao meu Deus, fonte de energia, que não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos.

Ao amado Ayrton, por mais uma vez abrir e iluminar os caminhos de nossas vidas, e principalmente pela orientação, paciência e apoio.

Às minhas filhas Rafaella e Manuella, por me tornarem completa e darem sentido a tudo que fiz, faço ou venha a fazer.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Felipe Francisco Tuon, orientador deste trabalho, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Ayrton Alves Aranha Junior, co-orientador deste trabalho, pela participação efetiva na fase de modelo experimental, ensinando todo trabalho de manipulação das cobaias e realizando os procedimentos cirúrgicos.

À bioquímica Lavinia Arend, pela identificação microbiológica e molecular das cepas e replicação sempre que necessário das amostras, além da amizade e apoio constantes.

Ao professor Daniel Fernandes responsável pelo biotério da UEPG pela disponibilidade e colaboração.

Às técnicas do biotério Marilene Terezinha Barbosa e Maria da Luz Pereira da Silva pela ajuda desinteressada, sem a qual seria impossível o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Ultrabo, responsável pelo Laboratório de Técnica Operatória da UEPG pela disponibilidade.

À Prof. Larissa Bail, microbiologista da UEPG pelo auxílio para o uso da estrutura do Laboratório-escola e auxílio nas técnicas de produção do inóculo bacteriano.

À Bioquímica Francine Manente pelo auxílio no uso do espectrofotômetro e diversas calibrações do inóculo bacteriano.

Ao Dr. Alexandre Zavascki e à bioquímica Vanessa Ribeiro pela realização do estudo *in vitro*.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa pela estrutura.

À CAPES e à UFPR pela oportunidade.

“O saber ensoberbece, mas o amor edifica. Se alguém julga saber alguma coisa, com efeito, não aprendeu ainda como convém saber.”1Co 8:1-2.

RESUMO

O tratamento mais eficaz para infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemases ainda não está estabelecido. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia de monoterapias e associações de antimicrobianos para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-KP) sensível a polimixina e tigeciclina e com CIM acima de 32mg/L para meropenem em um modelo experimental. A validação do inóculo bacteriano foi realizada previamente com uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em ratos adultos tratados com meropenem, definindo-se 1.0×10^{10} UFC/ml como dose para infecção potencialmente letal. Os ratos inoculados com 1.0×10^{10} UFC/ml de KPC-KPC via intraperitoneal foram tratados com meropenem (MER), polimixina (PMB) e tigeciclina (TIG) e diferentes associações destes antimicrobianos. O tempo de sobrevida, os resultados de hemoculturas e de culturas quantitativas de líquido peritoneal foram avaliados em animais tratados e nos controles. Um estudo *in vitro* de curvas de morte bacteriana com a mesma cepa de KPC-KP foi realizado. Variáveis contínuas foram analisadas com teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis foi usado para analisar as curvas de sobrevida. Os ratos inoculados com cepas produtoras de ESBL e de KPC apresentaram 80% de mortalidade quando mantidos sem antibioticoterapia. Terapia com MER em ratos infectados com cepa produtora de ESBL promoveu 60% de sobrevida ($p=0.042$) e redução da contagem de colônias abaixo de 5.0×10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em 80% ($p=0.001$), porém não houve diferença na positividade das hemoculturas entre os grupos. Nos animais inoculados com cepa produtora de KPC, o uso de MER, TIG e PMB em monoterapia promoveram respectivamente sobrevidas de 40%, 40% e 70% ($p=0.04$ PMB *versus* controle). As combinações contendo PMB promoveram 100% de sobrevida ($p<0.001$) e a associação de PMB e TIG foi sinérgica *in vitro*. Associação de MER e TIG promoveu menor sobrevida (70%) e teve efeito antagônico *in vitro*. Tratamento com PMB tanto em monoterapia como em associações reduziu a contagem de colônias abaixo de 5.0×10^4 UFC/mL ($p<0.001$) e a associação de PMB e TIG esterilizou 70% das hemoculturas. Conclui-se que combinações de antimicrobianos incluindo PMB foram superiores para promover sobrevida e esterilização de culturas e foram sinérgicas *in vitro*. Terapia tripla não foi superior a combinação de PMB com TIG *in vivo*.

Palavras chave: carbapenemase, KPC, associação de antimicrobianos, modelo experimental, tigeciclina, polimixina, meropenem

ABSTRACT

The most effective treatment for carbapenemase-producing enterobacterial infections has not yet been established. The aim of the study was to evaluate the efficacy of monotherapy and antimicrobial combinations for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-KP) susceptible to polymyxin and tigecycline and presenting MIC of 32 mg/L for meropenem in an experimental model. Validation of the bacterial inoculum was previously performed with an extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain (ESBL) in adult rats treated with meropenem, with 1.0×10^{10} UFC / ml being defined as a dose for potentially lethal infection. Mice inoculated with 1.0×10^{10} UFC / ml of KPC-KP intraperitoneally were treated with meropenem (MER), polymyxin (PMB) and tigecycline (TIG) and different combinations of these antimicrobials. Survival time, blood cultures and quantitative cultures of peritoneal fluid were evaluated in treated animals and controls. An *in vitro* study of time-to-kill curves with the same strain of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* was performed. Continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test was used to analyze the survival curves. Mice inoculated with ESBL and KPC-KP strains showed 80% mortality when kept without antibiotic therapy. MER therapy in mice infected with ESBL-producing strain promoted a 60% survival ($p=0.042$) and a reduction in colony counts below 5.0×10^4 colony forming units per milliliter (CFU/mL) by 80% ($p=0.001$), but there was no difference in the positivity of blood cultures between groups. In the animals inoculated with KPC-producing strain, the use of MER, TIG and PMB in monotherapy promoted respectively 40%, 40% and 70% survivals ($p=0.04$ PMB vs control). Combinations containing PMB promoted 100% survival ($p<0.001$) and the association of PMB and TIG was synergistic *in vitro*. Association of MER and TIG promoted lower survival (70%) and had an antagonistic effect *in vitro*. Treatment with PMB both in monotherapy and in combinations reduced colony counts below 5.0×10^4 CFU/mL ($p<0.001$) and the association of PMB and TIG sterilized 70% of blood cultures. It is concluded that combinations of antimicrobials including PMBs were superior to promote survival and sterilization of cultures and were synergistic *in vitro*. Triple therapy was not superior than the combination of PMB with TIG *in vivo*.

Key words: carbapenemase, KPC, antimicrobial combinations, experimental model, tigecycline, polymyxin, meropenem,

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MG/L) DOS ANTIBIÓTICOS AVALIADOS NO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE COM <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASE (1209RM).....	24
TABELA 2 -	TABELA 2. GRUPOS DE TRATAMENTO DE ACORDO COM O ANTIMICROBIANO EM USO PARA A CEPA PADRÃO DE <i>K. Pneumoniae</i> E CEPAS DE KPC-KP.....	27
TABELA 3 -	PROPORÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA NOS GRUPOS DE SUBMETIDOS A TRATAMENTO PARA SEPSE LETAL POR KPC-KP E GRUPO CONTROLE.....	32
TABELA 4 -	MÉDIAS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DETECTADAS EM CULTURA DE LÍQUIDO PERITONEAL POR GRUPO DE TRATAMENTO.....	33
TABELA 5 -	POSITIVIDADE DE HEMOCULTURAS POR GRUPO DE TRATAMENTO.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	SOBREVIDA EM HORAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 10^8 , 10^9 E 10^{10} UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO (UFC/mL) DAS CEPAS DE ESBL-KP E KPC-KP.....	30
FIGURA 2 -	SOBREVIDA DOS GRUPOS INFECTADOS COM $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL DE ESBL-KP - 6 ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE SEM TRATAMENTO E 6 ANIMAIS TRATADOS COM 30MG/KG DE MEROPENEM EM DOSE ÚNICA ADMINISTRADO 1 HORA APÓS A INDUÇÃO DA SEPSE.....	31
FIGURA 3 -	SOBREVIDA DOS GRUPOS INFECTADOS COM $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL DE ESBL-KP - 10 ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE SEM TRATAMENTO E 10 ANIMAIS TRATADOS COM 50mg/Kg DE MEROPENEM ADMINISTRADO IMEDIATAMENTE APÓS A INDUÇÃO DA SEPSE E A CADA 8 HORAS POR 24 HORAS.....	31
FIGURA 4 -	CURVAS DE SOBREVIDA EM 24 HORAS DOS ANIMAIS INFECTADOS COM KPC-KP E TRATADOS COM MONOTERAPIAS E TERAPIAS COMBINADAS E DO CONTROLE SEM TRATAMENTO.....	34
FIGURA 5 -	PROPORÇÕES DE SOBREVIDA E POSITIVIDADE DE CULTURAS DOS ANIMAIS INFECTADOS COM KPC-KP E TRATADOS COM MONOTERAPIAS E TERAPIAS COMBINADAS E DO CONTROLE SEM TRATAMENTO.....	34
FIGURA 6 -	CURVAS DE TEMPO-MORTE BACTERIANA DA CEPA KPC-KP USANDO AS COMBINAÇÕES PMB+TIG, PMB+MER, TIG+MER E PMB+TIG+MER.....	35

LISTA DE SIGLAS

BGN	- bacilo gram negativo
BMR	- bactéria multirresistente
CIM	- concentração inibitória mínima
COL	- colistina
ESBL	- “extended spectrum betalactamase” ou betalactamase de espectro estendido
ERC	- enterobactéria produtora de carbapenemase
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KPC-KP	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC
MER	- meropenem
NDM	- New Delhi Metallo-beta-lactamase
PMB	- polimixina B
UFC	- unidades formadoras de colônias
TIG	- tigeciclina
TKC	- “time-to-kill curves” ou curvas de tempo-morte bacteriana
VIM	- Verona integron-encoded metalobetalactamase

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	- quilograma
L	- litro
mg	- miligrama
ml	- mililitro
mm ³	- milímetro cúbico
UI	- unidade internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	JUSTIFICATIVA	14
1.2	OBJETIVOS	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	PROBLEMÁTICA DAS INFECÇÕES POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE KPC	16
2.2	CARACTERÍSTICAS DA <i>Klebsiella pneumoniae</i> CARBAPENEMASE (KPC)	17
2.3	OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS	17
2.4	ESTUDOS CLÍNICOS AVALIANDO A ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS	19
2.5	EMBASAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL	21
3	MÉTODO	23
3.1	COMITÊ DE ÉTICA	23
3.2	CEPAS BACTERIANAS	23
3.3	ANIMAIS	24
3.4	DETALHAMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO	24
3.5	INDUÇÃO DA SEPTICEMIA	26
3.6	TERAPIA ANTIMICROBIANA	26
3.7	PROCEDIMENTOS REALIZADOS E AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO INSTITUÍDO	27
3.8	ESTUDO <i>IN VITRO</i>	28
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	30
4.1	4.1 EMBASAMENTO DO MODELO COM CEPAS ESBL-KP E KPC-KP E TERAPIA DE SEPSE POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE ESBL	30
4.2	EMBASAMENTO DAS DOSES DE ANTIMICROBIANOS COM AVALIAÇÃO DE MONOTERAPIAS E TERAPIA COMBINADA EM SEPSE NÃO LETAL	31
4.3	EXPERIMENTO DE SEPSE LETAL POR KPC-KP COM MONOTERAPIAS, TERAPIAS COMBINADAS E CONTROLE SEM TRATAMENTO	32
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

Em meados da década passada começamos a conviver com surtos de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC) nos Serviços de Saúde. Dentre as bactérias multirresistentes (BMR), os bacilos gram negativos (BGN) resistentes a carbapenêmicos são os mais preocupantes devido às opções terapêuticas limitadas (NORDMANN, NAAS and POIREL, 2009; TZOUVELEKIS *et al.*, 2012). Tais fatos determinaram a necessidade de se estudar determinados antimicrobianos que ainda atuam contra ERC e associação dos mesmos a fim de avaliar opções com melhor desempenho para o tratamento de infecções causadas por ERC.

A maioria das ERC são resistentes a quinolonas e a todos os β lactâmicos, restando como opções terapêuticas apenas antimicrobianos como polimixinas, tigeciclina (TIG) e aminoglicosídeos. Tal fato explica a maior mortalidade de infecções por ERC do que por enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; FALAGAS *et al.*, 2014).

A eficácia destes tratamentos tem sido avaliada em coortes retrospectivas, em estudos *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo* descritos seguir:

Estudos retrospectivos avaliando o desfecho de pacientes com bacteriemia por KPC-KP demonstraram menor mortalidade para pacientes tratados com associação de antimicrobianos do que para aqueles tratados com monoterapia. As associações de antimicrobianos mais utilizadas e avaliadas retrospectivamente foram polimixinas com TIG, TIG com aminoglicosídeos, TIG com carbapenêmicos e polimixinas com carbapenêmicos, mesmo não estando estabelecido o benefício de manter o uso de carbapenêmicos para o tratamento destas infecções (HIRSCH e TAM, 2010; DAIKOS *et al.*, 2011; QURESHI *et al.*, 2012; TUMBARELLO *et al.*, 2012; DAIKOS *et al.*, 2014 e OLIVA *et al.*, 2014).

Estudos *in vitro* avaliando curvas de tempo-morte bacteriana (TKC) de ERC frente a TIG e colistina (COL) em monoterapia ou combinações, observaram que TIG isoladamente teve atividade antimicrobiana limitada e a associação com COL teve efeito antagônico em doses baixas (ALBUR *et al.*, 2012) e teve efeito sinérgico e foi bactericida em doses quatro vezes acima da CIM (POURNARAS *et al.*, 2011).

Dois modelos experimentais de infecção por ERC em ratos imunossuprimidos observaram diferentes desfechos com relação ao uso de monoterapia ou combinações de antimicrobianos. Docobo-Perez (2011) observou piores desfechos

em sobrevida e bacteriemias nos ratos com pneumonia tratados com monoterapia com COL. Michail (2013) observou que as combinações de TIG com COL e TIG com meropenem (MER) foram menos eficazes na redução da contagem de colônias em partes moles de roedores.

Idealmente, ensaios clínicos controlados e randomizados poderiam elucidar se a terapia combinada contra ERC tem benefícios sobre as monoterapias, assim como qual a melhor combinação. Porém, questões clínicas como a diversidade das cepas causando infecções, comorbidades e outras condições basais dos pacientes podem interferir no desfecho, além de questões éticas que limitam o desenho destes estudos impedem a realização de ensaios clínicos.

Estudos animais podem ser controlados, randomizados e demonstrar aspectos farmacológicos mais fielmente do que os estudos *in vitro* (GONNERT *et al.*, 2011) Os antimicrobianos em questão para o tratamento de KPC-KP como TIG e polimixinas podem apresentar resultados *in vitro* não extrapoláveis para a prática clínica devido a determinadas características farmacológicas (ROBERTS e LIPMAN, 2009). Tanto estudos *in vitro*, como os *in vivo* descritos apresentaram resultados conflitantes e nenhum experimento de sepse murina através de injeção intraperitoneal de KPC-KP até o momento estudou monoterapias em comparação com terapia combinada. Desta forma, optou-se pela realização de um modelo experimental para avaliar a eficácia de diferentes terapias contra ERC, visto que o melhor tratamento para infecções por estes micro-organismos ainda não está estabelecido.

Este estudo avaliou especificamente tratamentos para *Klebsiella pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-KP), a ERC mais prevalente na prática clínica (TOLEDO, OLIVEIRA e LUHM, 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

Diante da crescente resistência aos antimicrobianos e a diminuição do arsenal terapêutico disponível, é necessário o conhecimento a respeito da associação de antimicrobianos para o tratamento das infecções causadas por bactérias multirresistentes. Diante do aumento da incidência de cepas produtoras de KPC nos hospitais, da alta mortalidade atribuída e a incerteza sobre a terapêutica ideal, este

estudo tem como objetivo avaliar os desfechos da associação de antimicrobianos em modelo experimental de ratos infectados por KPC-KP.

Ensaio clínico controlado e randomizado em humanos ainda não foram delineados para avaliar diferenças entre as opções terapêuticas para o tratamento de KPC-KP. Estudos retrospectivos de terapêutica para KPC-KP sugerem que terapias combinadas apresentam menor falha terapêutica do que o tratamento com monoterapia, ao passo que estudos *in vitro* não demonstram consistentemente o efeito sinérgico destes medicamentos, além de não reproduzirem características farmacológicas que ocorrem *in vivo*.

As vantagens de infecções experimentais, neste contexto em que ensaios clínicos não estão disponíveis, são as seguintes: podem ser desencadeadas em animais previamente saudáveis, com inóculos bacterianos de concentrações-padrão e com início do(s) antimicrobiano(s) em tempo pré-estabelecido. Desta forma, fatores como doença de base e atraso no início do tratamento, ocorrência aleatória de diversos clones bacterianos e outros fatores secundários que podem interferir nos resultados de resposta terapêutica podem ser minimizados em estudos experimentais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Principal

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia em termos de sobrevida e resposta microbiológica do tratamento com monoterapias ou associações de antimicrobianos comparado com controles sem tratamento em modelo experimental de infecção potencialmente letal por KPC-KP com sensibilidade a polimixina B (PMB) e TIG e CIM acima de 32 mg/L para MER.

1.2.2 Objetivos Secundários

Validar um modelo experimental para estudos a respeito do tratamento de BMR através da avaliação da melhor concentração bacteriana do inóculo, doses de antimicrobianos e tempo de acompanhamento em horas após indução da infecção.

Avaliar o sinergismo ou antagonismo destes antimicrobianos *in vitro* contra a mesma cepa de KPC-KP através de curvas de tempo-morte bacteriana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROBLEMÁTICA DAS INFECÇÕES POR *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE KPC

Os primeiros relatos de KPC ocorreram em 2001 nos Estados Unidos (EUA). (YIGIT *et al.* 2001) Os maiores surtos descritos ocorreram na costa nordeste dos EUA e no sudeste europeu (BRATU *et al.* 2007; LEAVITT *et al.* 2010).

A presença de KPC-KP no Brasil já é descrita desde 2005 (PAVEZ, MAMIZUKA e LINCOPAN, 2009) e 2006 (MONTEIRO *et al.*, 2009). Desde então, vários casos foram relatados em diversos estados do país, como Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco e Paraíba (PEIRANO *et al.*, 2009; FEHLBERG *et al.*, 2012 e CABRAL *et al.*, 2012).

Infecções causadas por KPC-KP e outras ERC ocorrem frequentemente em nosso meio. Em 2010, infecções hospitalares por ERC eram 0,3% das infecções por bactérias multirresistentes (BMR) e 0,08% de todas as infecções hospitalares de Curitiba (TOLEDO, OLIVEIRA e LUHM, 2012). Em 2014, infecções por ERC representaram 19,37% dos BMR e 5,62% das infecções hospitalares deste município (WASZAK, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2015).

Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo de infecções por bactérias produtoras de KPC, fato preocupante uma vez que as opções terapêuticas para o tratamento são limitadas (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). KPC-KP está associada com infecções graves e com alta mortalidade (MOULOUDI *et al.*, 2010; GASINKI *et al.*, 2009; TUON *et al.*, 2012 e FALAGAS *et al.*, 2014).

Existe dificuldade de tratamento das mesmas pela indisponibilidade de um antimicrobiano bactericida com garantia de níveis séricos e teciduais adequados, desta forma, mortalidade e morbidade com internação prolongada e aumento de custos hospitalares são consequências (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013).

A alta mortalidade atribuída a infecções causadas por estas bactérias tornam este aumento de casos um problema de saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento, como o Brasil em que o número e a qualidade de leitos hospitalares e pré-hospitalares muitas vezes não oferecem condições adequadas de

precauções de contato. O aprimoramento das práticas sanitárias e o uso correto e pelo mínimo tempo necessário são ferramentas essenciais para o controle desta epidemia (AKOVA *et al.*, 2012)

2.2 CARACTERÍSTICAS DA *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE (KPC)

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) é uma serina carbapenemase do grupo A da classificação molecular de Ambler e subgrupo 2f da classificação funcional de Bush (BUSH e JACOBY, 2010 e AMBLER R. P., 1980).

Esta enzima ocorre predominantemente em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, embora a presença de KPC tenha sido descrita também em *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. (BRATU *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2008 e NORDMANN, NAAS e POIREL, 2009). O gene responsável pela produção de KPC é o *bla_{KPC}*, localizado em um transposon denominado Tn4401 na maioria das cepas, com potencial risco de transmissão entre os bacilos Gram-negativos (NAAS *et al.*, 2008).

O presente estudo avaliou infecção por uma cepa de KPC-KP, mas a revisão da literatura descreve estudos com outras cepas de ERC, como as produtoras de metalo- β -lactamses da classe B de Ambler: New-Delhi metalo- β -lactamase (NDM) e Verona integron-encoded metalo- β -lactamase (VIM).

2.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

Os carbapenêmicos são antimicrobianos com alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina e grande estabilidade frente à maioria das β -lactamses, atravessam a membrana de BGN através da porina Omp K35 e 36, característica que confere alta permeabilidade para penetrar a membrana de BGN (BONFIGLIO, RUSSO e NICOLETTI, 2002). As ERC possuem um dos seguintes mecanismos de resistência: produção de enzimas que hidrolizam os carbapenêmicos

(carbapenemases); perda da porina Omp; efluxo do antimicrobiano pela membrana externa (QUEENAN e BUSH, 2007).

Carbapenêmicos não devem ser utilizados como monoterapia para o tratamento de ERC. O meropenem é o agente mais utilizado desta classe na prática clínica e, para uso em infecções por ERC, preconiza-se dose de 2g endovenoso a cada 8 horas e em infusão prolongada (3 horas), para permanecer mais tempo acima da CIM (KUTI *et al.*, 2013). Não está estabelecido o benefício de manter o uso de carbapenêmicos em associação com outras classes de antimicrobianos para o tratamento destas infecções, sobretudo em cepas com concentração inibitória mínima (CIM) elevada para MER. TUMBARELLO *et al.* (2012) e DAIKOS *et al.*, (2014) relatam ausência de benefício do uso de carbapenêmicos nas cepas com CIM acima de 16 mg/L, enquanto que OLIVA *et al.*, 2014 relatam três casos de resposta com a associação de MER com ertapenem para cepas com CIM acima de 32 mg/L.

Na vigência de resistência aos carbapenêmicos, as opções terapêuticas restringem-se a classes de antimicrobianos como as fluoroquinolonas, os aminoglicosídeos, as polimixinas e a TIG (PETROSILLO *et al.*, 2013). Em nosso meio, a grande maioria das amostras clínicas contém ERC com resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (WASZAK, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2015). Desta forma, as opções ativas contra ERC limitam-se às polimixinas e TIG.

Tigeciclina é uma glicilciclina que apresenta maior afinidade para inibição da subunidade ribossômica 30S do que outras tetraciclinas, porém ainda assim tem ação bacteriostática por ser uma ligação reversível (BERGERON *et al.*, 1996). Apresenta atividade contra ERC e está aprovada para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles e infecções intra-abdominais (POSTIER R. G. *et al.*, 2004; BABINCHAK T. *et al.*, 2005; BREEDT J. *et al.*, 2005; ELLIS-GROSSE E. J. *et al.*, 2005; OLIVA M. E. *et al.*, 2005; SACCHIDANAND S. *et al.*, 2005; TANASEANU C. *et al.*, 2008; TOWFIGH S. *et al.*, 2010; VARDAKAS K. Z., RAFAILIDIS P. I. e FALAGAS M. E. 2012). Concentrações inadequadas desta droga foram encontradas tanto no plasma como nos alvéolos, o que levanta hipótese da necessidade de combinação com outras drogas e uso de doses mais elevadas (100mg endovenoso 12/12h) para o tratamento de infecções por ERC (FALAGAS *et al.*, 2014 e VARDAKAS *et al.*, 2015).

Polimixinas são antimicrobianos ativos contra a maioria dos BGN, incluindo a maior parte das ERC, exceto contra algumas espécies de *Proteus*, além de ação limitada em *Providencia*, *Burkholderia* e *Serratia*. As polimixinas penetram através das membranas celulares e interagem com fosfolipídeos de membrana, possuem cátions que interagem com íons dos lipopolissacarídeos bacterianos, promovendo rotura da membrana. Polimixinas são antibióticos nefrotóxicos e neurotóxicos que estavam em desuso desde os anos 40, porém a ocorrência de BMR levou a necessidade de reutilizá-los (FALAGAS e KASIAKOU, 2005; NATION *et al.*, 2007; ZAVASCKI *et al.*, 2008; SANDRI *et al.*, 2013 e NI *et al.*, 2015). No Brasil, a PMB é a mais disponível, a dose recomendada é de 25.000 a 30.000 UI/kg/dia dividida em duas doses, ou seja 12.500-15.000 UI/kg a cada 12 horas.

2.4 ESTUDOS CLÍNICOS AVALIANDO A ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

Possivelmente a terapia combinada apresente melhor resposta terapêutica do que monoterapias para micro-organismos resistentes, sobretudo em infecções sistêmicas e com critérios de gravidade. A terapia combinada pode teoricamente suprimir a emergência de resistência e proporcionar efeito sinérgico (MOUTON *et al.*, 1999). Zusman (2013) observou sinergismo e prevenção de resistência com o uso de terapia combinada em uma metanálise de estudos *in vitro* que combinavam polimixinas com carbapenêmicos.

Com base nestes dados teóricos e *in vitro*, vários pacientes são tratados com terapia combinada e coortes observacionais retrospectivas realmente demonstram este benefício, porém a combinação ideal ainda não foi definida.

Hirsch e Tam (2010) foram pioneiros em compilar dados retrospectivos tentando elucidar a melhor terapia para BGN produtores de KPC. Avaliaram 55 casos publicados em 15 artigos e relataram que a associação TIG e aminoglicosídeos e polimixinas em terapias combinadas levavam a melhores resultados do que a monoterapia com polimixinas.

Qureshi (2012) relatou que num grupo de 41 pacientes com bacteriemia por KPC-KP que a associação de antimicrobianos foi um fator preditivo de sobrevivência. Nesta série houve 57,8% de mortalidade em 28 dias nos casos tratados com monoterapia *versus* 13,3% de mortalidade nos tratados com terapia combinada que inclui principalmente as associações de MER com TIG ou MER com PMB ou COL. Tumbarello (2012) avaliou retrospectivamente 125 bacteriemias por KPC-KP e concluiu que a associação de duas ou três drogas (incluindo carbapenêmicos, desde que a CIM seja abaixo de 16 mg/L para meropenem) promove 65,9% de sobrevivência podendo ser mais efetiva do que monoterapia (54,3% de mortalidade). Fatores como APACHE III elevado, choque séptico e terapia inicial incorreta foram preditivos de mortalidade. Estes dois estudos supracitados foram incluídos na metanálise de Lee e Burgess (2012) que compilou 105 casos de vários sítios de infecção por KPC-KP para avaliar falha ao tratamento com monoterapia e terapia combinada. A definição de falha não menciona claramente se a mesma estava baseada em mortalidade ou falha microbiológica. O estudo conclui que terapia combinada promove menos falhas terapêuticas (25%) do que monoterapias (49%). Nas infecções pulmonares a monoterapia tem maior número de falhas (67%) do que em outros sítios. Este estudo sugere a necessidade de ensaios clínicos que possam definir qual das associações (polimixina e TIG, polimixina e MER e polimixina e aminoglicosídeo) é a preferencial e mais eficaz.

Daikos (2014) avaliou 205 pacientes com bacteriemia por ERC (KPC e/ou VIM, uma metalo- β lactamase da classe B de Ambler). A mortalidade geral em 28 dias foi de 40% e de 65% entre os neutropênicos. A mortalidade foi significativamente maior no grupo tratado com monoterapia do que naqueles com terapia combinada. O grupo com menor mortalidade (19,3%) foi o de pacientes tratados com combinações contendo carbapenêmicos em cepas com CIM para MER \leq 8 mg/L. Fatores basais do paciente e choque séptico foram preditores independentes de mortalidade.

Oliva (2014) relatou três casos de terapia com associação de ertapenem e meropenem, em infecções por cepas com CIM para MER bastante elevadas. Um dos pacientes foi a óbito, mas todos tiveram resposta microbiológica.

Tumbarello (2015) compilou infecções de vários centros entre 2010 e 2013, entre as quais 68% eram bacteriemias e observou que a mortalidade geral em 14 dias foi de 34,1%. Além dos fatores que já havia demonstrado anteriormente como

preditores de mortalidade (choque séptico, terapia empírica inadequada e escore elevado no APACHE III) relatou insuficiência renal crônica e resistência à COL como fatores de mau prognóstico. Terapia combinada (com pelo menos dois antibióticos ativos *in vitro*) foi relacionada a menor mortalidade, sobretudo nos pacientes com bacteriemia. Para o tratamento das cepas com CIM \leq 8 mg/L para MER, incluir este agente na terapia combinada foi significativamente associado com maior sobrevida.

Desfecho favorável em terapia combinada também foi observado em estudos que avaliaram associações em infecções do trato urinário (SATLIN *et al.*, 2011 e ALEXANDER *et al.*, 2012).

O uso excessivo de antibióticos pode provocar maior resistência bacteriana (DEL ARCO *et al.*, 2015). Desta forma, avaliaremos duoterapias e terapia tripla a fim de averiguar se este acúmulo de antimicrobianos prescritos é realmente necessário para o tratamento eficaz contra estes patógenos resistentes.

2.5 EMBASAMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

A fim de embasar um modelo que pudesse estudar a eficácia de antimicrobianos e associações para o tratamento de KPC-KP, modelos experimentais prévios de terapia antimicrobiana em septicemias induzidas por injeção intraperitoneal de diferentes inóculos de BGN em camundongos e ratos foram revisados. Além disso, estudos experimentais prévios embasaram a escolha de doses de MER, PMB e TIG a ser empregada neste experimento.

Observou-se que em peritonite experimental em ratos os inóculos variaram de 10^5 (em animais imunossuprimidos) a 10^{10} (em imunocompetentes) unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *E. coli*, e foram letais nas concentrações de 10^9 a 10^{10} UFC/mL (DAVIS, 1975; GIACOMETTI *et al.*, 2002; CIRIONI *et al.*, 2002) e não letais com 10^5 a 10^8 UFC/mL (WANDALL *et al.*, 1997; BOSSCHA *et al.*, 2000). Modelos de pneumonia em ratos também foram realizados com inóculos de 10^{10} UFC/mL (KESTEMAN *et al.*, 2009 e MIMOZ *et al.*, 2000). Nos estudos de peritonite letal citados, cerca de 80% dos controles sem tratamento evoluem para óbito em 24 a 48 horas.

Estudos de registro do meropenem utilizaram doses de 20mg/kg a cada 8 horas em experimentos com animais (FUKASAWA *et al.*, 1992), posteriormente

doses de 30mg/kg a cada 8 horas foram utilizadas em estudo de tratamento de pneumonia por *Enterobacter* spp. em ratos pois esta espécie produz uma di-hidropeptidase pulmonar que degrada o meropenem (MIMOZ *et al.*, 2000). Chang (2002) usou 50mg/kg a cada 8 horas para atingir níveis teciduais adequados na bile e Hilliard (2011) usou 50mg/kg para tratamento de pneumonia por ESBL-KP em ratos.

Murphy (2000) demonstrou que 14mg/kg/dia é eficaz na redução da contagem de colônias de cocos Gram-positivos em endocardite experimental. No experimento de Docobo-Perez (2011) que incluiu dados farmacocinéticos, a dose de TIG foi 5mg/kg a cada 12 horas refletiu os parâmetros farmacocinéticos humanos de uma dose intravenosa de 200mg. Em ambos os estudos a dose de TIG foi administrada por via subcutânea. Em outros modelos de infecção por cocos Gram-positivos e infecções polimicrobianas, TIG foi utilizada em doses de 2 a 5mg/kg a cada 12 horas via intraperitoneal (CIRIONI *et al.*, 2010; SIMONETTI *et al.*, 2012; MINARDI *et al.*, 2012).

Estudos embasam melhor a dose de colistina em experimentos (DUDHANI *et al.*, 2010), porém, como na prática clínica local a PMB é mais disponível nos serviços, optamos pela dose de PMB baseada no estudo de Abdelraouf (2012) que utilizou 4mg/kg ao dia.

Os modelos experimentais envolvendo tratamento de infecções por ERC encontrados na literatura foram realizados em camundongos imunossuprimidos.

Endimiani (2011) estudou peritonite experimental com 3×10^5 UFC/mL para avaliar a eficácia de um inibidor de β -lactamase contra KPC-KP.

Docobo-Perez (2011) avaliou associação de COL e TIG, em comparação com cada um destes antimicrobianos em monoterapia, em pneumonia murina por ERC produtoras de NDM. Neste estudo, a terapia combinada foi tão efetiva quanto a monoterapia com TIG e ambas, mais efetivas do que a monoterapia com COL.

Michail (2013) realizou infecção de coxa com diferentes cepas de KPC-KP e observou maior eficácia em reduzir contagem de colônias com as combinações de TIG e rifampicina e TIG e gentamicina e demonstrou ainda antagonismo entre COL e TIG e entre MER e TIG.

3 MÉTODO

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animal (CEUA) da Pro-reitoria de pesquisa e pós graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), após parecer da Comissão de Biossegurança do Campus UEPG.

Processo 21/2012 Protocolo: 06309/2012 (ANEXO I)

3.2 CEPAS BACTERIANAS

A cepa de KPC-KP utilizada neste estudo foi proveniente de amostra clínica (sangue de paciente) identificada pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN). A cepa denominada 1209RM PR apresenta o perfil de resistência demonstrado na Tabela 1.

Uma cepa padrão de ESBL-KP (ATCC 700603) foi utilizada previamente para a padronização do modelo de tratamento e da dose de MER.

Durante a produção dos inóculos, tanto a ATCC 700603 como a 1209RM eram semeadas em meio Mueller-Hinton (MH) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias eram diluídas e homogeneizadas em solução salina isotônica estéril para formar inóculos. Estas soluções eram centrifugadas a 2500 rotações por minuto por 5 minutos e as concentrações eram aferidas. A fim de obter medidas mais acuradas de inóculos, utilizou-se um espectrofotômetro (Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer Perkin Elmer®) com densidade óptica de 625nm. Inóculos com $1,5 \times 10^{10}$ UFC/mL correspondiam a soluções de cloreto de bário e ácido sulfúrico de 50 (5% de H₂SO₄ e 5% de BaCl₂) e a absorvância desta solução era de 2.343. De acordo com a lei de Beer-Lambert, absorvâncias acima de 0.890 não são acuradas para medir contagem de micro-organismos, assim, após diluição de 1:20 (0,1mL do inoculo : 1,9mL de solução salina), os inóculos de $1,5 \times 10^{10}$ UFC/mL apresentavam absorvâncias de 0.543. Os inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram obtidos com 0,7ml da solução de $1,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Todos os inóculos produzidos para injeção intraperitoneal eram diluídos 1:10000 e semeados com alça de 1 microlitro em placa de ágar sangue e incubados para contagem de colônias.

O detalhamento da padronização do inóculo está publicado em artigo contido no ANEXO II.

TABELA 1. Concentração inibitória mínima (mg/l) dos antibióticos para a cepa KPC-KP 1209RM

	Método utilizado para obtenção da CIM (mg/L)		
	E-test	Vitek 2	Diluição em caldo
Meropenem	>32	>16	
Tigeciclina	2	<0.5	<0.5
Polimixina	1	<0.5	<1

CIM - Concentração inibitória mínima

3.3 ANIMAIS

Ratos adultos de ambos os sexos, da raça Wistar, sendo os machos com peso médio de 240 a 340g e as fêmeas com peso médio de 190 a 290g foram utilizados. Durante o estudo os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, com dieta padrão e água natural *ad libidum*.

Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e foram acondicionados por 48 horas antes do início do experimento. A indução da sepse, a terapia antimicrobiana, a eutanásia e a manipulação de amostras biológicas foram realizadas no laboratório de técnica operatória da UEPG. Durante todo o período de estudo os animais foram mantidos em temperatura ambiente de 20 a 22° C.

3.4 DETALHAMENTO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os grupos de animais incluídos para a padronização do inóculo, padronização de tempo de dose de antimicrobianos estão descritos a seguir:

- 46 animais em modelo de padronização de dose, inoculados com diferentes doses de inóculos (10^8 , 10^9 , 10^{10} UFC/mL) das cepas ATCC 700603 como a 1209RM, para avaliar o tempo de sobrevida em horas e a taxa de mortalidade em 24 horas. Foram 5 grupos de 6 ratos cada inoculados com: ESBL-KP $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, KPC-KP $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ESBL-KP $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, KPC-KP $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, ESBL-KP $6,0 \times 10^9$ UFC/mL, e 2 grupos de 8 ratos cada inoculados com ESBL-KP $1,5 \times 10^{10}$ UFC/mL e inoculados com KPC-KP $1,5 \times 10^{10}$ UFC/mL.

- 12 animais inoculados com a cepa ATCC 700603 em $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL em modelo de padronização de tempo e dose de antibioticoterapia com meropenem. Foram 2 grupos de 6 ratos cada, saber: grupo controle sem tratamento e grupo tratado com 30mg/kg de meropenem 1 hora após a indução da sepse, em dose única.

- 20 animais inoculados com a cepa ATCC 700603 em $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL em modelo de padronização de tempo e dose de antibioticoterapia com meropenem. Foram 2 grupos de 10 ratos cada, a saber: grupo controle sem tratamento e grupo tratado com 50mg/kg a cada 8 horas por 24 horas de meropenem e início imediato após a indução da sepse.

- 36 animais em modelo de sepse não letal com inóculo de $0,9 \times 10^8$ UFC/mL KPC-KP (cepa 1209RM) para validar o uso de terapias combinadas de antimicrobianos e observar dados microbiológicos (hemoculturas e culturas de líquido peritoneal) 24h após a indução da infecção. Foram 12 grupos de 3 ratos cada, a saber: controle sem tratamento, monoterapias com TIG, MER, PMB e gentamicina (GEN), TIG com MER; TIG com PMB; TIG com GEN; PMB com MER; PMB com GEN; MER com GEN e TIG com MER com PMB.

- 80 animais em modelo de sepse letal com inóculo de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL de KPC-KP (cepa 1209RM) para avaliar a eficácia de monoterapias e terapia combinadas através de taxa de sobrevida e resultados microbiológicos. Foram 8 grupos de 8 animais cada, a saber: controle sem tratamento, monoterapias com TIG, MER e PMB, TIG com MER; TIG com PMB; PMB com MER e TIG com MER com PMB.

Todos os grupos continham animais distribuídos aleatoriamente, mas obedecendo a um número homogêneo de ratos quanto ao sexo, idade e peso médio. Em cada fase do experimento foram utilizados 3 a 4 animais de cada grupo

infectados com soluções frescas das cepas descritas, de modo que em cada dia de estudo cada grupo teve o mesmo número de animais infectados com aquele inóculo.

3.5 INDUÇÃO DA SEPTICEMIA

Os animais foram infectados por injeção intraperitoneal em quadrante inferior direito após antissepsia local com clorexidine alcoólico 0,5%. Os diferentes grupos receberam cepas de ESBL-KP ou de KPC-KP. Alíquotas de 0,7 mL do inóculo descrito previamente foram injetadas em todos os animais.

Sepse foi induzida através de injeção intraperitoneal dos inóculos descritos com agulha de 26 gauge no quadrante inferior direito do abdômen. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas.

3.6 TERAPIA ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos foram administrados via intraperitoneal, no quadrante abdominal inferior direito dos animais, imediatamente após a indução da septicemia.

A dose de MER foi definida após análise do estudo de validação do inóculo (ANEXO II) em que foi avaliada a resposta dos animais com as doses de 30mg/kg e 50mg/kg a cada 8 horas, sendo optado pela maior dose.

Após a fase de padronização, a antibioticoterapia durou 24h de acordo com a posologia de cada medicação. Os medicamentos utilizados foram: polimixina B (Eurofarma), Meronem® (Astra-Zêneca) e Tigacyl® (Pfizer).

A fim de validar as combinações de antimicrobianos e observar se as doses eleitas teriam impacto microbiológico, foi realizado um estudo de sepsis não letal com um inóculo menos concentrado ($0,9 \times 10^8$ UFC/mL), utilizando três ratos em cada grupo de terapia. Foram utilizadas as monoterapias com gentamicina (GEN), TIG, MER e PMB, e terapia combinada com TIG e MER, TIG e PMB, TIG e GEN, MER e PMB, MER e GEN, PMB e GEN, terapia tripla com PMB, TIG e MER e controle sem tratamento. Os resultados do mesmo foram publicados e encontram-se no anexo III.

Os grupos e doses de tratamentos utilizados nos experimentos de sepse letal com KPC-KP encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2. Grupos de tratamento de acordo com o antimicrobiano em uso para a cepa padrão de *K. pneumoniae* e cepas de KPC-KP

Grupo	Antibiótico e dose
EBSL-KP	Controle (sem antibiótico)
	Meropenem 50mg/kg 8/8h
KPC-KP	Controle (sem antibiótico)
	Meropenem 50mg/kg 8/8h
	Polimixina B 2mg/kg 12/12h
	Tigeciclina 7mg/kg 12/12h
	Meropenem 50mg/kg 8/8h + Tigeciclina 7mg/kg 12/12h
	Meropenem 50mg/kg 8/8h + Polimixina B 2mg/kg 12/12h
Polimixina B 2mg/kg 12/12h + Tigeciclina 7mg/kg 12/12h	
Meropenem 50mg/kg 8/8h + Tigeciclina 7mg/kg 12/12h + Polimixina B 2mg/kg 12/12h	

3.7 PROCEDIMENTOS REALIZADOS E AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO INSTITUÍDO

As taxas e o tempo de sobrevivência dos diferentes grupos de tratamento foram avaliadas a partir da inoculação intraperitoneal, dentro de 24 horas. Análises microbiológicas de hemoculturas e culturas quantitativas de líquido peritoneal foram realizadas para definir a resposta aos diferentes esquemas terapêuticos.

A manipulação de amostras biológicas como sangue e líquido peritoneal ocorreu após a morte dos animais, quando estes espécimes foram coletados para cultura. Todos os animais que não morreram após 24 horas da sepse foram submetidos a eutanásia, realizada com dose letal subcutânea de quetamina 50mg/kg e xilazina 5mg/kg.

Imediatamente após a morte, foi colhido: 1) uma amostra de sangue para hemocultura obtidas por punção intracardíaca com técnica asséptica com clorexidina (ALCOOLICO 0,5%) e; 2) uma amostra de líquido peritoneal por técnica asséptica através de incisão peritoneal e injeção de volume de soro fisiológico.

O sangue foi incubado em frasco de hemocultura pediátrico em BHI da Newprov®. O líquido peritoneal cultivado puro e após a diluição de 0,1mL do mesmo (1:1000) em soro fisiológico para cultura quantitativa após incubação desta solução em meio McConkey. Todas as culturas foram incubadas a 37° C. A hemocultura foi realizada manualmente e semeada meio McConkey após 18 a 20 horas de incubação em BHI. As hemoculturas negativas em 18 horas permaneceram incubadas e foram semeadas novamente em 36 horas, em 48 horas e em 72 horas, se necessário.

3.8 ESTUDO *IN VITRO*

O ensaio de curvas tempo-morte bacteriana (TKC) foi realizado conforme as orientações do Clinical Laboratory Standards International (NCCLS, 1999) e foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi realizada a inoculação de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL da cepa em estudo em 10mL de caldo Muller-Hilton fresco com ajuste de cátions (Oxide Basigstoke, UK) e incubação em 35°C. MER 4mg/L, TIG 1mg/L e PMB 0,25mg/L foram testados isoladamente e nas mesmas combinações do estudo *in vivo*. Alíquotas foram retiradas em 1, 6, 12 e 24 hora após a inoculação. Amostras foram diluídas seriadamente (10^{-1} a 10^{-8}) e semeadas em duplicata em ágar sangue para contagem de colônias. As curvas de tempo-morte bacteriana foram construídas com a contagem de colônias em cada tempo citado. Os resultados foram interpretados em 24 horas.

Este ensaio *in vitro* avaliou o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos na tentativa de inibir o crescimento bacteriano de cepas de bactérias causadoras de infecções. Avaliou a concentração do antimicrobiano e a morte da bactéria em diferentes intervalos de tempo do ensaio. O número médio de UFC/mL obtidas com antimicrobiano combinado e sozinho é comparado com o controle sem antimicrobiano. Os resultados são expressos em log de UFC/mL. O sinergismo é definido como $\geq 2 \log_{10}$ na diminuição da contagem de colônias em 24 horas comparado a combinação de agente sozinho mais ativo. Atividade bactericida é definida como uma redução maior do que $3 \log_{10}$ da contagem total de UFC/mL no

inóculo original. Atividade bacteriostática é definida como manutenção ou redução menor do que $3\log_{10}$ do número total de UFC/mL no inóculo original.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para dimensionar o tamanho total da amostra em estudo foi considerada como principal variável de interesse a proporção de mortes. Sendo assim, tem-se a fórmula para dimensionamento de amostras que estima proporção: $n = z^2 PQ/d^2$. Onde “n” é o tamanho da amostra, “z” o valor tabelado da distribuição normal correspondente ao nível de confiança pretendido, “P” é a proporção de 50% (maior variabilidade possível), “Q” é “1- P” e “d” é o maior desvio aceitável, ou seja, erro que estamos dispostos a aceitar. Considerando um nível de confiança de 95,0% e o erro amostral máximo de 8% o tamanho da amostra total deve ser de 100 a 140 ratos. Assim, em cada um dos 10 grupos de estudo foram incluídos 10 ratos: 2 grupos com ESBL-KP e 8 grupos com KPC-KP.

Os dados contínuos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana com os extremos. As frequências foram expressas em porcentagens. Para as variáveis contínuas foram aplicados os testes de Fischer e Mann Whitney (para comparação entre 2 grupos) e Kruskal-Wallis (para comparação entre vários grupos) e para as curvas de sobrevivência o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon e Log-rank. O nível de significância foi de 0,5.

4 RESULTADOS

4.1 EMBASAMENTO DO MODELO COM CEPAS ESBL-KP E KPC=KPC E TERAPIA DE SEPSE POR *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE ESBL

Experimentos da fase de embasamento de modelo ocorreram de 21 a 23 de julho de 2012, 31 de julho a 02 de agosto de 2012 e 12 a 14 de outubro de 2012. As Figura 1 demonstra o tempo de sobrevida em horas após a inoculação com as diferentes concentrações bacterianas das cepas de ESBL-KP e KPC-KP.

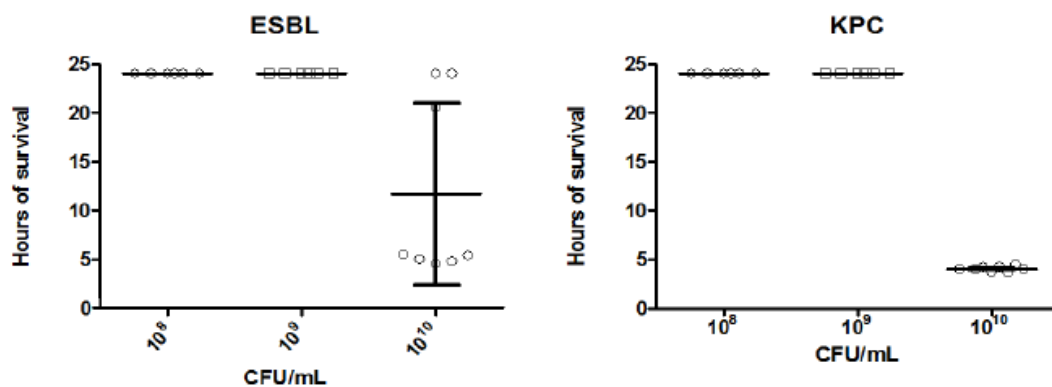


FIGURA 1 – Sobrevida em horas após a inoculação com 10⁸, 10⁹ e 10¹⁰ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) das cepas de ESBL-KP e KPC-KP.

As Figuras 2 e 3 demonstram os resultados da terapia com meropenem em diferentes doses para os animais infectados com duas concentrações de inóculos letais de ESBL-KP. Estes dados encontram-se no artigo do ANEXO II. Observamos na Figura 2 que com o inóculo mais concentrado, 90% dos animais morriam apesar do tratamento. Com esta dose inoculada não foi possível avaliar diferenças microbiológicas entre as amostras de líquido peritoneal e hemoculturas dos animais tratados e dos controles. Na Figura 3 observa-se que 80% dos ratos tratados sobreviviam ao inóculo eleito de 1.0 x 10⁹ UFC/mL e a terapia com meropenem 50mg/kg a cada 8 horas promoveu 60% de sobrevida em 24 horas no grupo de ratos infectados com ESBL-KP, significativamente superior aos controles não tratados.

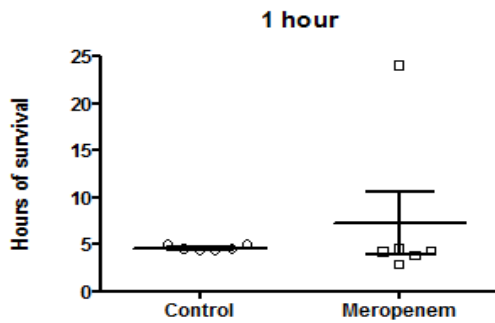


FIGURA 2 – Sobrevida dos grupos infectados com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL de ESBL-KP - 6 animais do grupo controle sem tratamento e 6 animais tratados com 30mg/kg de meropenem em dose única administrado 1 hora após a indução da sepse.

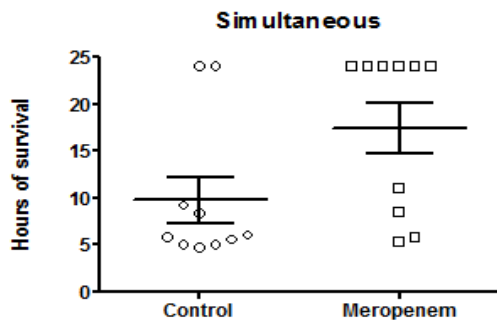


FIGURA 3 – Sobrevida dos grupos infectados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL de ESBL-KP - 10 animais do grupo controle sem tratamento e 10 animais tratados com 50mg/kg de meropenem administrado imediatamente após a indução da sepse e a cada 8 horas por 24 horas.

4.2 EMBASAMENTO DAS DOSES DE ANTIMICROBIANOS COM AVALIAÇÃO DE MONOTERAPIAS E TERAPIA COMBINADA EM SEPSE NÃO LETAL

Experimentos da fase de embasamento da terapia ocorreram de 26 a 28 de janeiro de 2013. As doses de antibióticos eleitas para a terapia antimicrobiana foram testadas inicialmente em modelo de sepse não letal a fim de avaliar o efeito destas combinações em comparação com as monoterapias na contagem de colônias do líquido peritoneal e na positividade de hemoculturas, conforme o artigo do ANEXO III. Observou que as únicas monoterapias que não esterilizaram o líquido peritoneal

foram TIG e MER. As combinações de TIG associado a MER e PMB associado a MER não foram capazes de negatizar hemoculturas.

4.3 EXPERIMENTO DE SEPSE LETAL POR KPC-KP COM MONOTERAPIAS, TERAPIAS COMBINADAS E CONTROLE SEM TRATAMENTO

Experimentos da fase de terapia de sepse letal por KPC-KP ocorreram de 31 de maio a 02 de junho de 2013 e 17 a 20 de julho de 2013. Oitenta animais subdivididos aleatoriamente em oito grupos conforme descrito no método e tratados conforme Tabela 2 foram analisados.

A Tabela 3 demonstra as proporções de sobrevivência em 24 horas destes animais e as curvas de sobrevivência encontram-se na Figura 4. A Tabela 4 e a Figura 5 demonstram as médias de UFC/mL de líquido peritoneal por grupo de tratamento. A Tabela 5 e a Figura 5 demonstram a positividade de hemoculturas por grupo de tratamento.

Os animais tratados com PMB em monoterapia, PMB e TIG e terapia tripla (PMB, TIG e MER) apresentaram redução significativa da contagem de colônias do líquido peritoneal em relação aos outros grupos ($p < 0,001$).

Os animais tratados com PMB e TIG apresentaram a maior taxa de negatização das hemoculturas (70%), sendo significativo em relação aos grupos controle, MER e TIG e MER ($p = 0,0019$).

TABELA 3. Proporções de sobrevivência nos grupos de submetidos a tratamento para sepse letal por KPC-KP e grupo controle

Grupo	n	mortes	Sobrevivência	
			n	%
Controle	10	8	2	20,0%
MER	10	6	4	40,0%
TIG	10	6	4	40,0%
PMB	10	3	7	70,0%
MER e PMB	10	0	10	100,0%
MER e TIG	10	3	7	70,0%
PMB e TIG	10	0	10	100,0%
PMB e TIG e MER	10	0	10	100,0%

Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B

TABELA 4. Médias de unidades formadoras de colônias detectadas em cultura de líquido peritoneal por grupo de tratamento

Grupo	N	Média (UFC/mL)	Desvio padrão	p
Controle	10	800.010	349.578	
MER	10	760.010	406.044	
TIG	10	516.910	452.345	
PMB	10	11.350	30.610	<0.001*+‡#
MER e TIG	10	410.600	302.288	
MER e PMB	10	50.150	158.061	<0.001*+‡#
PMB e TIG	10	1.050	2.809	<0.001*+‡#
PMB e TIG e MER	10	260	613	<0.001*+‡#

Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B
UFC – unidades formadoras de colônias

* - em relação ao grupo controle (teste Mann-Whitney)

+ - em relação ao grupo TIG (teste Mann-Whitney)

‡ - em relação ao grupo MER (teste Mann-Whitney)

- em relação ao grupo MER e TIG (teste Mann-Whitney)

TABELA 5. Positividade de hemoculturas por grupo de tratamento

Grupo	n	hemoculturas positivas	p
Controle	10	9	
MER	10	9	
TIG	10	9	
PMB	10	8	
MER e PMB	10	6	
MER e TIG	10	9	
PMB e TIG	10	3	0.019*+‡#
PMB e TIG e MER	10	6	

Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B

* - em relação ao grupo controle (teste Exato de Fisher)

+ - em relação ao grupo TIG (teste Exato de Fisher)

‡ - em relação ao grupo MER (teste Exato de Fisher)

- em relação ao grupo MER e TIG (teste Exato de Fisher)

Estes dados do modelo de comparação de terapias em sepse letal por KPC-KP estão publicados no artigo do ANEXO IV.

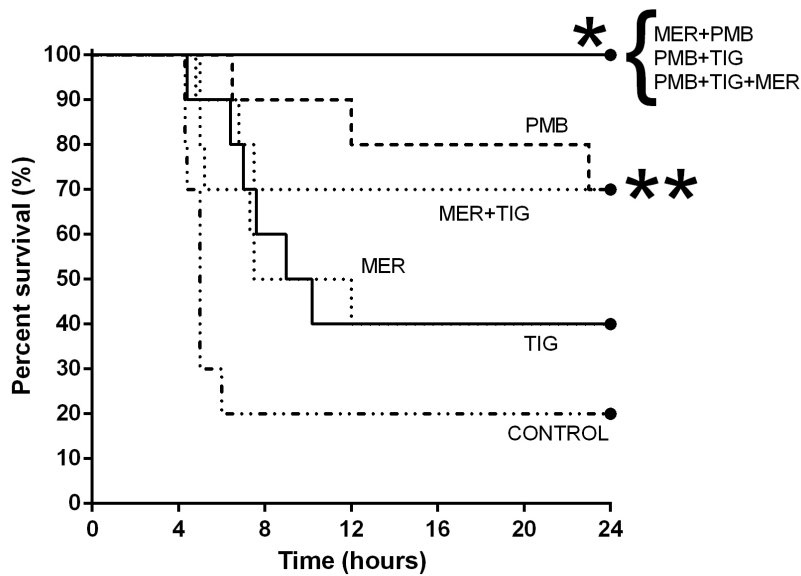


Figura 4 – Curvas de sobrevida em 24 horas dos animais infectados com KPC-KP e tratados com monoterapias e terapias combinadas e do controle sem tratamento. Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B

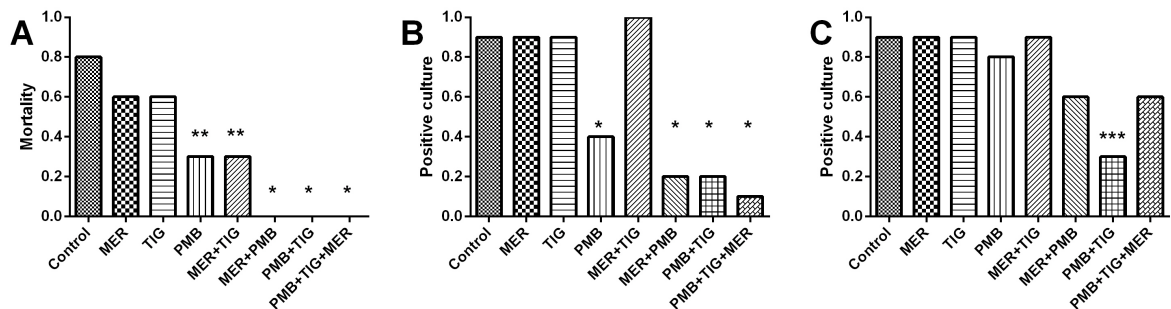


Figura 5 – proporções de mortalidade e positividade de culturas dos animais infectados com KPC-KP e tratados com monoterapias e terapias combinadas e do controle sem tratamento

A. Proporções de mortalidade dos animais infectados com KPC-KP e tratados com monoterapias e terapias combinadas e do controle sem tratamento (* $p < 0,05$ em comparação com PMB, MER+TIG, MER, TIG e controle; ** $p < 0,05$ em comparação com MER, TIG e controle). B. Proporções de culturas peritoneais positivas após o óbito ou eutanásia nos animais infectados com KPC-KP e tratados com monoterapias e terapias combinadas e do controle sem tratamento (* $p < 0,05$ em comparação com MER+TIG, MER, TIG e controle). C. Proporções de hemoculturas positivas após o óbito ou eutanásia nos animais infectados com KPC-KP e tratados com monoterapias e terapias combinadas e do controle sem tratamento (***) $p < 0,05$ em comparação com MER+TIG, MER, TIG e controle).

Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B

As curvas de tempo-morte bacteriana da cepa de KPC-KP incubada com MER, PMB, TIG, MER+TIG, MER+PMG, PMB+TIG e PMB+TIG+MER estão representadas na Figura 6. A terapia tripla e a associação PMB+TIG foram bactericidas e com efeito sinérgico. A combinação MER+TIG teve efeito antagônico.

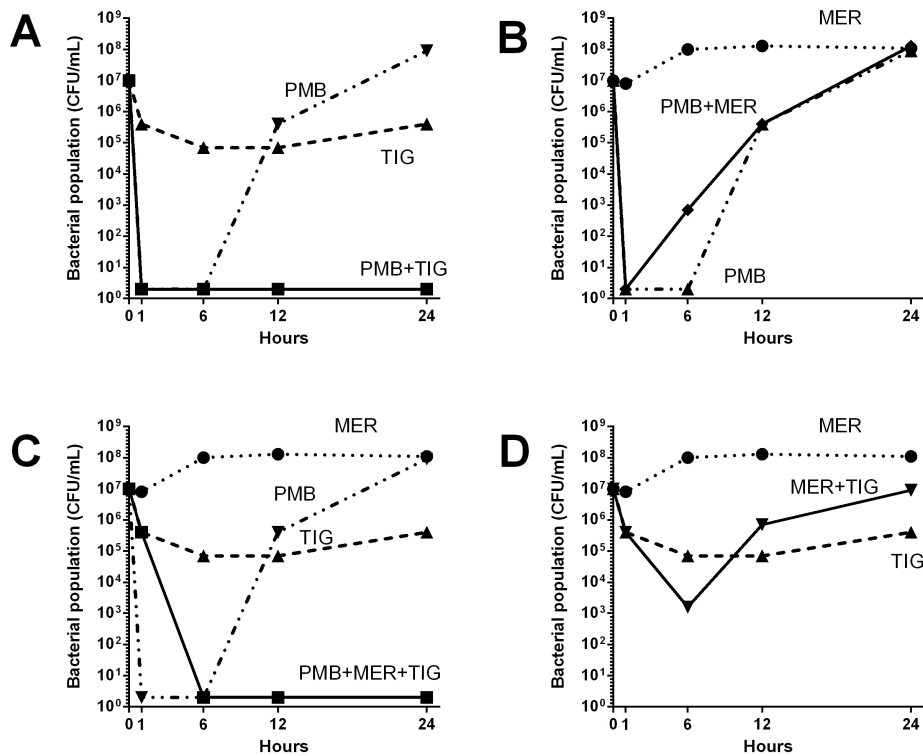


Figura 6 – Curvas de tempo-morte bacteriana da cepa KPC-KP usando as combinações PMB+TIG, PMB+MER, TIG+MER e PMB+TIG+MER.

A. associação PMB+TIG teve efeito sinérgico e foi bactericida. B. associação PMB+MER não teve efeito sinérgico e não foi bactericida. C. associação PMB+TIG+MER teve efeito sinérgico e foi bactericida. D. associação MER+TIG teve efeito antagônico e não foi bactericida.

Legenda: MER – meropenem, TIG – tigeciclina, PMB – polimixina B

5 DISCUSSÃO

Após a análise de diferentes concentrações de inóculos bacterianos na sobrevida dos animais e da avaliação de resposta ao meropenem para sepse por ESBL-KP, foi possível a reprodução de modelo experimental de tratamento de sepse por BMR.

Estudos clínicos retrospectivos embasam o uso de terapia combinada para infecções por ERC (TUMBARELLO *et al.*, 2012; QURESHI *et al.*, 2012 e DAIKOS *et al.*, 2014) e sugerem que o uso de MER é satisfatório para cepas com CIM para MER abaixo de 8 mg/L (DAIKOS *et al.*, 2014). Uma cepa com CIM acima de 16 mg/L foi escolhida para promover infecção experimental e tratamento com monoterapias e terapias combinadas contendo MER, com tempo padrão de início da terapia antimicrobiana.

Em termos de sobrevida, as monoterapias não garantiram a mesma eficácia do que as combinações de PMB com TIG ou PMB com MER ou terapia tripla, corroborando os estudos citados (TUMBARELLO *et al.*, 2012; QURESHI *et al.*, 2012 e DAIKOS *et al.*, 2014). A monoterapia com polimixina foi a mais eficaz, superando os resultados obtidos com a combinação MER com TIG. Com isso, existe a possibilidade de monoterapia com PMB ser uma opção para infecções menos graves e localizadas, sobretudo no trato urinário.

Terapia tripla para esta cepa com sensibilidade a PMB e TIG e CIM elevada para MER não foi superior à combinação de TIG e PMB, diferente do observado nos estudos clínicos retrospectivos em que a CIM para MER não era tão elevada (TUMBARELLO *et al.*, 2015). Tal informação é importante para garantir que o uso excessivo de antimicrobianos possa ser evitado e a terapia antimicrobiana seja otimizada. DEL ARCO (2015) administrou o uso de antimicrobianos por 3 anos, com otimização do tratamento obtida através da redução do espectro de antibióticos e ajuste da dose, intervalo de dosagem e duração do tratamento e com isso, o perfil de sensibilidade de BGN a carbapenêmicos aumentou em 10%, demonstrando a necessidade do uso criterioso de antimicrobianos.

A combinação de PMB e MER demonstrou impacto na sobrevida e cultura de líquido peritoneal, mas não foi superior do que a monoterapia com PMB na esterilização de hemoculturas. Mai uma vez, ressaltamos que combinações possam

ser desnecessárias em alguns subgrupos de infecções menos graves ou localizadas nas quais a monoterapia com PMB possa ser eficaz. Por outro lado, a associação PMB e MER deve ser estudada com mais detalhes em estudos prospectivos, visto que pode ser importante na sobrevida de casos mais graves, principalmente em bacteriemias, sítio em que tigeciclina não está aprovada (POSTIER R. G. *et al.*, 2004; BABINCHAK T. *et al.*, 2005; BREEDT J. *et al.*, 2005; ELLIS-GROSSE E. J. *et al.*, 2005; OLIVA M. E. *et al.*, 2005; SACCHIDANAND S. *et al.*, 2005; TANASEANU C. *et al.*, 2008; TOWFIGH S. *et al.*, 2010; VARDAKAS K. Z., RAFAILIDIS P. I. e FALAGAS M. E. 2012).

Estudos prospectivos incluindo cepas com CIM menores para meropenem ou mesmo cepas com CIM elevadas são necessários para avaliar desfechos em pacientes tratados com monoterapia PMB, PMB+MER e PMB+TIG.

Os achados observados *in vivo* em termos de eficácia microbiológica, corresponderam aos resultados do estudo *in vitro*, o que pode ser observado comparando-se os dados descritos nas Figuras 5 e 6. As combinações de PMB+TIG e PMB+TIG+MER foram mais eficazes em termos de sobrevida, resposta microbiológica e também demonstraram sinergismo *in vitro*.

A combinação de TIG e MER foi antagônica *in vitro*, conforme já observado em outros estudos (POURNARASA *et al.*, 2011) e sugerido em nosso estudo de sepse não letal.

A principal limitação deste estudo foi a análise de uma única cepa de KPC-KP. Tal fato foi devido ao número de animais disponibilizados pelo CEUA, sendo necessário novo projeto para aprovação de maior número de cobaias para este fim, Outra limitação é a ausência de análises de farmacocinética que certamente poderá ser abordada em estudos futuros.

Com relação a doses dos antimicrobianos, observamos que estudos publicados após a realização deste experimento que ocorreu entre julho de 2012 e julho de 2013, utilizaram doses mais elevadas de meropenem e polimixina. Bowers (2015) que tratou pneumonia em ratos neutropênicos, utilizou 10mg/kg de PMB. Michail (2013) utilizou 200mg/kg a cada 8 horas de meropenem e 50mg/kg/dia de tigeciclina ambos via subcutânea. A dose de tigeciclina utilizada por Michail (2013) é aparentemente excessiva com base nos estudos prévios de Murphy (2000) e Docobo-Perez (2011). Porém a dose de meropenem utilizada neste experimento, embasada em estudos prévios (MIMOZ *et al.*, 2000, CHANG *et al.*, 2002), merece

ser questionada a partir da publicação de Michail (2013) que ocorreu após o término deste experimento, pois pode ter sido abaixo do necessário e talvez por isso a sobrevivência dos ratos infectados com ESBL-KP foi de 60% e o uso de MER demonstrou benefício parcial na associação com PMB.

6 CONCLUSÃO

As associações de antimicrobianos, sobretudo PMB combinada com TIG e terapia tripla (PMB, TIG e MER) são mais eficazes em termos de sobrevida e resposta microbiológica do que monoterapias para o tratamento de infecção potencialmente letal por uma cepa de KPC-KP com sensibilidade a PMB e TIG e alta CIM para MER em um modelo experimental. A terapia tripla não foi mais eficaz do que a associação de PMB e TIG em termos de esterilização de hemoculturas para esta cepa específica.

Este modelo experimental, validou a dose de inóculo bacteriano, o uso de antimicrobianos e o tempo de 24 horas para a avaliação da sobrevida em sepse murina por BMR. Doses mais elevadas de meropenem poderão ser avaliadas em modelos futuros.

Houve sinergismo *in vitro* para a combinação de PMB e TIG e antagonismo *in vitro* para a combinação de TIG e MER contra esta cepa de KPC-KP e esses achados foram comparáveis com os achados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAOUF K. Pharmacokinetics and Renal Disposition of Polymyxin B in an Animal Model. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 56, n. 11, p. 5724-27, 2012.
- AKOVA M. *et al.* Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect.** New Jersey, v. 18, n. 5, p. 439-48, 2012.
- ALBUR M. *et al.* Bactericidal Activity of Multiple Combinations of Tigecycline and Colistin against NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents Chemother.** Washington, v. 56, n. 6, p. 3441–3443, 2012.
- ALEXANDER B.T. *et al.* Treatment and clinical outcomes of urinary tract infections caused by KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a retrospective cohort. **Clin Ther.** Philadelphia, v. 34, n. 6, p. 1314–1323, 2012.
- AMBLER R. P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.** Londres, v. 289, n. 1036, p. 321–31, 1980.
- BABINCHAK T. *et al.* The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 41 (Suppl 5), p. S354-67, 2005.
- BERGERON J., *et al.* Glycylcyclines bind to the high affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 40, p. 2226-2228, 1996.
- BONFIGLIO G., RUSSO G., NICOLETTI G. Recent developments in carbapenems. **Expert Opin Invest Drugs.** Londres, v. 11, p. 529-544, 2002.
- BOSSCHA K. *et al.* A standardised and reproducible model of intraabdominal infection and abscess formation in rats. **Eur J Surg.** Chichester, v. 166, n. 12, p. 963-7, 2000.
- BOWERS D.R., *et al.* Assessment of minocycline and polymyxin B combination against *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother.** Washington, v.59, n. 5, p 2720-5, 2015.
- BRATU S. *et al.* Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 44, n. 7, p 972-5, 2007.
- BREEDT J. *et al.* Safety and efficacy of tigecycline in treatment of skin and skin structure infections: results of a double-blind phase 3 comparison study with vancomycin-aztreonam. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 49, p. 4658-66, 2005.

BUSH K., JACOBY G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 54, n. 3, p.969–76, 2010.

CABRAL A. B. *et al.* Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** Uberaba, v. 45, n. 5, p. 572-8, 2012.

CAI J. C. *et al.* Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta lactamase **KPC-2** in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrobial Agents Chemother.**, Washington,v. 52, n. 6, p. 2014–8, 2008.

CHANG, Y. L. *et al.* Determination and pharmacokinetic study of meropenem in rat bile using on-line microdialysis and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** Amsterdam, v. 961, p. 119–124, 2002.

CIRIONI O. *et al.* Single-Dose Intraperitoneal Magainins Improve Survival in a Gram-Negative-Pathogen Septic Shock Rat Model. **Antimicrobial Agents Chemother.**, Washington,v. 46, n. 1, p. 101–104, 2002.

CIRIONI O. *et al.* S-thanatins enhances the efficacy of tigecycline in an experimental rat model of polymicrobial peritonitis. **Peptides.** Baton Rouge, v. 31, n. 7, p. 1231-6, 2010.

DAIKOS G.L., MARKOGIANNAKIS A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? **Clin. Microbiol. Infect.** Oxford, v. 17, p. 1135–1141, 2011.

DAIKOS G.L. *et al.* Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 58, n. 4, p. 2322–2328, 2014.

DAVIS S. D. *et al.* Activity of Gentamicin, Tobramycin, Polymyxin B, and Colistimethate in Mouse Protection Tests with *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 8, n. 1, p. 50-53, 1975.

DEL ARCO A. *et al.* The impact of an antimicrobial stewardship programme on the use of antimicrobials and the evolution of drug resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** Berlin, v. 34, n. 2, p. 247-51, 2015.

DOCOBO-PÉREZ F. *et al.* Efficacies of colistin and tigecycline in mice with experimental pneumonia due to NDM-1-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Intern J Antimicrobial Agents.** Birmingham, v. 39, p 251–254, 2012.

DUDHANI R. V. *et al.* Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 54, p. 1117–24, 2010.

ENDIMIANI A. *et al.* Evaluation of Ceftazidime and NXL104 in Two Murine Models of Infection Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. Washington, v., 55, n. 1, p. 82–85, 2011.

ELLIS-GROSSE E. J. *et al.* The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. **Clin Infect Dis**. Boston, v. 41 (Suppl 5), p. S341-53, 2005.

FALAGAS M. E. e KASIAKOU S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis**. Boston, v. 40, p. 1333–1341, 2005.

FALAGAS M. E. *et al.* Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. **Emerg Infect Dis**. Atlanta, v.20, p. 1170-75, 2014.

FALAGAS M. E. *et al.* Effectiveness and safety of high-dose tigecycline-containing regimens for the treatment of severe bacterial infections. **Int J Antimicrob Agents**. Birmingham, v. 44, p. 1–7, 2014.

FEHLBERG L. C. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**. Salvador, v. 16, n. 6, p. 577-80, 2012.

FUKASAWA M. *et al.*, 1992 Stability of meropenem and effect of 1 β -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. **Antimicrob Agents Chemother**. Washington, v. 36, n. 7, p. 1577-79, 1992.

GASINK L. B. *et al.* Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infect Control Hosp Epidemiol**. Chicago, v. 30, n. 12, p. 1180-5, 2009.

GIACOMETTI A. *et al.* Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. **J Antimicrob Chemother**. Birmingham, v. 46, n. 1, p. 101-104, 2002.

GONNERT F. A. *et al.* Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. **J Surg Res**. Oxford, v. 170, n. 1, p. e123-34, 2011.

HILLIARD J. J. *et al.* Comparative effects of Carbapenems on bacterial load and host immune response in a *Klebsiella pneumoniae* murine pneumonia model. **Antimicrob Agents Chemother**. Washington, v. 55, n. 2, p. 836-44, 2011.

HIRSCH E. B., TAM V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. **J Antimicrob Chemother**. Birmingham, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.

KUTI J. L. *et al.* Use of Monte Carlo simulation to design an optimized pharmacodynamic dosing strategy for meropenem. **J. Clin. Pharmacol.** Maden, v.43, p.1116–1123, 2003.

LEAVITT A. *et al.* Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 54, n. 7, p. 3002-6, 2010

LEE G. C., BURGESS D. S. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** Londres, v. 11, p 32, 2012.

MICHAIL G. *et al.* Activity of Tigecycline in combinations with Colistin, Meropenem, Rifampin, or Gentamicin against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 57, n. 12, p. 6028-33, 2013.

MIMOZ O. *et al.* Efficacies of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 44, n. 4, p. 885-90, 2000.

MINARDI D. *et al.* Efficacy of Tigecycline and Rifampin Alone and in Combination against *Enterococcus faecalis* Biofilm Infection in a Rat Model of Ureteral Stent. **J Surg Res.** v. 176, n. 1, p. 1-6, 2012.

MONTEIRO J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.

MOUTON J.W. *et al.* Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy *in vivo*. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 43, n. 10, p. 2473–2478, 1999.

MUNOZ-PRICE L.S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis.** Oxford, v. 13, n. 9, p. 70190-7, 2013.

MOULOUDI E., PROTONOTARIOU E., ZAGORIANOU A. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. **Infect Control Hosp Epidemiol.** Chicago, v. 31, n. 12, p. 1250-6, 2010.

MURPHY T. M. *et al.* Therapeutic Efficacy of GAR-936, a Novel Glycylcycline, in a Rat Model of Experimental Endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 44, n. 11, p. 3022-27, 2000.

NATION L, Li J. Optimizing use of colistin and polymyxin B in the critically ill. **Semin Respir Crit Care Med.** New York, v. 28, p. 604-614, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A, vol. 19. NCCLS, Wayne. PA

NI W. *et al.* Efficacy of polymyxins in the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: a systematic review and meta-analysis. **Braz J Infect Dis.** Salvador, v. 19, p. 170–180, 2015.

NORDMANN P., NAAS T., POIREL L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis.** Atlanta, v. 17, n. 10, p. 1791-98, 2009.

OLIVA M. E. *et al.* A multicenter trial of the efficacy and safety of tigecycline versus imipenem/cilastatin in patients with complicated intra-abdominal infections. **BMC Infect Dis.** Londres, v. 5, p. 88-100.

OLIVA A. *et al.* Synergistic activity and effectiveness of a double-carbapenem regimen in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **J Antimicrob Chemother.** Birmingham v. 69, n. 6, p. 1718-20, 2014.

PAVEZ M., MAMIZUKA E. M., LINCOPAN N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO G. *et al.* Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.** Birmingham, v. 63, p. 265-268, 2009

PETROSILLO N. *et al.* Treatment of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. **Expert Rev Anti Infect Ther.** Londres, v. 11, p. 159–177, 2013.

POSTIER R. G. *et al.* Results of a multicenter, randomized, open-label efficacy and safety study of two doses of tigecycline for complicated skin and skin-structure infections in hospitalized patients. **Clin Ther.** Philadelphia, v. 26, p. 704-14, 2004.

POURNARASA, S. *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. **Intern Journal Antimicrobial Agents.** Birmingham, v. 37, p. 244–247, 2011.

QUEENAN A. M., Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin Microbiol Rev.** Washington, v. 20, p. 440-458, 2007.

TOLEDO P. V., OLIVEIRA J. C., LUHM K. R. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. **J Hosp Infect.** Londres, v. 80, p. 351-53, 2012.

QURESHI Z. A. *et al.* Treatment Outcome of Bacteremia due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 56, n. 4, p. 2108-12, 2012.

ROBERTS J. A., LIPMAN J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. **Crit Care Med.** Mount Prospect, v. 37, n. 3, p. 840-51, 2009.

SACCHIDANAND S. *et al.* Efficacy and safety of tigecycline monotherapy compared with vancomycin plus aztreonam in patients with complicated skin and skin structure infections: Results from a phase 3, randomized, double-blind trial. **Int J Infect Dis.** Amsterdam, v. 9, p. 251-61, 2005.

SANDRI A.M. *et al.* Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 57, n. 4, p. 524-31, 2013.

SATLIN M. J. *et al.* Comparative Effectiveness of Aminoglycosides, Polymyxin B, and Tigecycline for Clearance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from Urine. **Antimicrob Agents Chemother.** Washington, v. 55, n. 12, p. 5893-99, 2011.

SIMONETTI O. *et al.* Tigecycline accelerates staphylococcal-infected burn wound healing through matrix metalloproteinase-9 modulation. **J Antimicrob Chemother.** Birmingham, v. 67, n. 1, p. 191-201, 2012.

TANASEANU C. *et al.* Integrated results of 2 phase 3 studies comparing tigecycline and levofloxacin in community-acquired pneumonia. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Amsterdam, v. 61, p. 329-38, 2008.

TOWFIGH S. *et al.* A multicentre, open-label, randomized comparative study of tigecycline versus ceftriaxone sodium plus metronidazole for the treatment of hospitalized subjects with complicated intra-abdominal infections. **Clin Microbiol Infect.** New Jersey, p. 16, v. 1274-81, 2010.

TUMBARELLO M. *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by KPC-Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 55, n. 7, p. 943-50, 2012.

TUMBARELLO M. *et al.* Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **J Antimicrob Chemother.** Birmingham, v. 70, n. 7, p. :2133-43, 2015.

TUON F. *et al.* Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Braz J Infec Dis.** Salvador, v. 16, n. 5, p. 416-9, 2012.

TZOUVELEKIS L.S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin. Microbiol. Rev.** Bethesda, v. 25, p. 682–707, 2012.

VARDAKAS K. Z., RAFAILIDIS P. I., FALAGAS M. E. Effectiveness and safety of tigecycline: focus on use for approved indications. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 54, p. 1672-4, 2012.

VARDAKAS K. Z. *et al.* Tigecycline for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in the intensive care unit. **Infect Dis.** Londres, v 47, n. 10, p. 755-7, 2015.

WANDALL D. A., ARPI M., WANDALL J. H. A rat model of non-lethal bacterial infection. **APMIS**. Lyngø, v. 105, n. 3, p. 187-91, 1997.

WASZAK, OLIVIERA e OLIVEIRA, 2015. Relatório Epidemiológico das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no município de Curitiba. Disponível em :
<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/relatorio-epidemiologico-das-infecoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-no-municipio-de-curitiba-em-2014> .

YIGIT H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.

ZAVASCKI A. P. *et al.* Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. **Clin Infect Dis.** Boston, v. 47, p. 1298-1304, 2008.

ZUSMAN O. *et al.* Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 57, n. 10, p. 5104-11, 2013.

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 21/2012

Protocolo UEPG – 06309/2012

Título – “Avaliação da associação de antimicrobianos em modelo experimental de infecção por *Klebsiella pneumoniae*”.

Interessado – Ms. Paula Virginia Michelin Toledo

Data de Entrada – 20/04/2012

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
10/07/2014

Considerações

Prezada Professora,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 150 ratos Wistar.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

Professor Dr. Giovanni Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

ANEXO II – ARTIGO DE VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

ABCDV/1029

ABCD Arq Bras Cir Dig
2014;27(3):168-171

Artigo Original

MODELO EXPERIMENTAL DE TRATAMENTO DE SEPSE POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE BETALACTAMASE DE AMPLO ESPECTRO*Experimental model for treatment of extended spectrum betalactamase producing-Klebsiella pneumoniae*Paula Virginia Michelon TOLEDO^{1,2,6}, Felipe Francisco TUON^{1,3,6}, Larissa BAIL⁴,
Francine MANENTE⁴, Polliane ARRUDA¹, Ayrton Alves ARANHA-JUNIOR^{1,5}

Trabalho realizado no ¹Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR; ²Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR; ³Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; ⁴Departamento de Farmácia e Bioquímica, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa; ⁵Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba; ⁶Programa de Pós-graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

DESCRIPTORIOS - *Klebsiella pneumoniae*. Sepsis. Modelos animais.

RESUMO – *Racional:* Modelos animais são importantes para avaliar a eficácia de antimicrobianos e a validação do sítio de infecção e a carga bacteriana. *Objetivo:* Definir a concentração do inóculo bacteriano, a dose e o tempo de administração de antimicrobianos a fim de validar um modelo experimental para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de amplo espectro em sepsis letal. *Método:* Inóculos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido de $1,5 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) a $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram administrados via injeção peritoneal em ratos Wistar adultos. Sobrevida e dados microbiológicos de hemoculturas e culturas quantitativas de fluido peritoneal foram avaliados inicialmente em animais não tratados. Animais inoculados com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados dose única de meropenem (30mg/kg) e animais inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados imediatamente com meropenem (50 mg/kg) por 24 horas e os desfechos foram avaliados após 24 horas da inoculação. *Resultados:* Soluções com $1,5 \times 10^9$ e $6,0 \times 10^9$ UFC/ml não foram letais. Inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em 80% e 100% dos animais respectivamente. Sepsis letal ($1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL) com tratamento imediato e por 24 horas apresentou 40% de mortalidade, comparada com 80% nos controles ($p=0,033$). Culturas quantitativas de fluido peritoneal apresentaram $\leq 10^4$ UFC/ml enquanto que controles sem tratamento apresentaram $> 10^8$ UFC/ml ($p=0,001$). *Conclusão:* Modelo experimental com inóculo de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml submetido ao tratamento imediato e por 24 horas foi capaz de avaliar resposta microbiológica e de sobrevida podendo ser modelo de embasamento e de controle para tratamento de sepsis letal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

Correspondência:Paula Toledo
Email: paulavmtoledo@yahoo.com.br

Fonte de financiamento: A pesquisadora Paula Virginia Michelon Toledo recebeu bolsa de doutorado pela CAPES.
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 30/01/2014
Aceito para publicação: 13/05/2014

HEADINGS - *Klebsiella pneumoniae*. Sepsis. Models, animal.

ABSTRACT - *Background:* Animal models are useful to evaluate the efficacy of antimicrobials in experimental sepsis. *Aim:* To elucidate the steps of producing an experimental model for the treatment of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* sepsis. *Methods:* Several ESBL inoculums ranging from $1,5 \times 10^9$ colony-forming units per milliliter (CFU/mL) to $2,0 \times 10^{10}$ CFU/mL were administered by peritoneal injection in adults Wistar rats. Outcomes and microbiological data of quantitative peritoneal and blood cultures were observed in untreated animals. Animals which received $2,0 \times 10^{10}$ CFU/mL inoculums were treated with single meropenem dose (30mg/kg) after one hour and those which received $1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL inoculums were treated immediately with three doses of meropenem 50 mg/kg. Outcomes were observed for 24 hours after inoculation. *Results:* Solutions with $1,5 \times 10^9$ and $6,0 \times 10^9$ CFU/mL were not lethal within 24 hours. Inoculums of $1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL were lethal in 80% and solutions with $2,0 \times 10^{10}$ CFU/mL were lethal in 100% of animals. ESBL lethal sepsis ($1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL) was treated immediately with 50 mg/kg of meropenem every eight hours for 24 hours and presented 40% mortality compared with 80% mortality of the control group ($p=0,033$). Quantitative cultures of peritoneal fluid presented 10^4 CFU/mL or less for treated animals compared to more than 10^8 for untreated animals ($p=0,001$). *Conclusion:* Inoculums of $1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL achieved the best results to study a model of lethal sepsis and this model of treatment of carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae* can serve as control to further evaluation of treatment of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* models.

INTRODUÇÃO

A incidência de enterobactérias produtoras de carbapenemases aumentou consideravelmente em nosso meio e o tratamento ideal para estes microrganismos não está estabelecido. Alguns estudos retrospectivos sugerem que a associação de antimicrobianos pode ser benéfica^{10,11,12}. A resposta de diferentes antibióticos no tratamento de microrganismos específicos pode ser avaliada através de mortalidade global, tempo de sobrevida e taxa de cura microbiológica. Tais desfechos podem sofrer influência de outros fatores clínicos e desta forma, modelos experimentais são úteis na avaliação da combinação de antimicrobianos para o tratamento de enterobactérias produtoras de carbapenemases até que ensaios clínicos avaliem esta hipótese. Um modelo experimental de tratamento de enterobactérias produtora de betalactamase de espectro estendido (ESBL), sensível a carbapenêmicos seria útil para controlar modelos de tratamento de enterobactérias produtoras de carbapenemases.

Modelos animais de tratamento de enterobactérias em peritonite, pneumonia e de infecção de partes moles após imunossupressão foram revisados e nenhum foi encontrado definindo o inóculo bacteriano e o tempo de terapia para ESBL. Modelos de peritonite em ratos utilizaram inóculos de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de

colônias por mililitro (UFC/ml) de *E. coli*. Sepse letal para ratos foi estudada com inóculo de 10^9 a 10^{10} UFC/ml^{2,3,5} e não letal com inóculos de 10^5 a 10^8 UFC/ml¹³. Os modelos que estudaram *Klebsiella pneumoniae* foram de peritonite em camundongos neutropênicos (3×10^5 UFC/ml)⁴, infecção de partes moles em ratos neutropênicos (10^6 / 10^8 UFC/ml)^{6,8} e modelos de pneumonia em ratos (10^6 / 10^{10} UFC/ml)⁷. Inóculos de 10^{10} UFC/ml de *Enterobacter* spp também foram avaliados em modelos de pneumonia em ratos⁹.

É necessária a padronização de concentrações de inóculo de *Klebsiella pneumoniae* a fim de determinar um modelo de sepsse letal capaz de ser reprodutível e válido para avaliar a eficácia da terapia antimicrobiana na redução da mortalidade e no tempo de sobrevida de animais tratados com terapia padrão. O número de doses de antimicrobiano e o tempo de tratamento também devem ser padronizados. Uma vez validado, o modelo poderia servir de controle para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

Desta forma, o presente estudo visa validar um modelo experimental de sepsse letal e tratável de peritonite por *K. pneumoniae* ESBL em ratos não neutropênicos, através da definição da concentração ideal de inóculo, bem como da posologia a ser empregada de meropenem.

MÉTODO

Animais

O experimento foi realizado com ratos Wistar adultos (20-24 semanas) de ambos os sexos com peso médio de 200-340 g. Foram mantidos sob temperatura (22-24° C) e umidade adequadas, em ciclo dia-noite artificial, recebendo dieta-padrão e água ad libitum. A comissão de ética para o uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa aprovou o estudo. Foram incluídos 50 animais nas diferentes fases deste experimento.

Cepas bacterianas, produção do inóculo e indução da sepsse

Uma cepa-padrão de *K. pneumoniae* ESBL (ATCC 700603) foi inoculada em meio Mueller-Hinton e incubada a 37° C por 24 horas. As colônias foram diluídas e homogeneizadas em solução salina isotônica estéril para formar inóculos.

As soluções eram centrifugadas a 2500 rotações por minuto por cinco minutos e as concentrações eram aferidas. Inicialmente, utilizou-se densímetro (Densimat Biomerieux®) capaz de medir densidades de 0,5 a 7,5 McFarland para aferir a concentração do inóculo. Concentrações de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml eram obtidas em 5 McFarland. A fim de obter medidas mais acuradas de inóculos, utilizou-se espectrofotômetro (Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer Perkin Elmer®) com densidade óptica de 625 nm. Inóculos com $1,5 \times 10^{10}$ e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml correspondiam às soluções de cloreto de bário e ácido sulfúrico de 50 (5% de H_2SO_4 e 5% de $BaCl_2$) e 67 (3,3% de H_2SO_4 e 6,7% de $BaCl_2$) McFarland e as absorvâncias destas soluções eram de 2.343 e 2.764 respectivamente. De acordo com a lei de Beer-Lambert, absorvâncias acima de 0.890 não são acuradas para medir contagem de microorganismos; assim, após diluição de 1:20, os inóculos de $1,5 \times 10^{10}$ e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml apresentaram absorvâncias de 0.543 e 0.633. Os de $6,0 \times 10^9$ UFC/ml e $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram obtidos diluindo 0,4 ml e 0,6 ml da solução de $1,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Todos os inóculos produzidos para injeção intraperitoneal eram semeados em Mueller-Hinton e incubados por oito horas para confirmar contagem de colônias antes da indução da sepsse.

Sepsse foi induzida através de injeção intraperitoneal dos inóculos descritos com agulha de 26 gauge no quadrante inferior direito do abdome. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas.

A letalidade do inóculo foi definida através da observação após injeção de solução com $1,5 \times 10^9$ UFC/ml em

seis animais, $6,0 \times 10^9$ UFC/ml em outros seis, $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml em dez animais e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml em outros dez.

Terapia antimicrobiana

Dois grupos com sepsse letal por *K. pneumoniae* ESBL foram tratados com meropenem (Astra-Zeneca®). Doze ratos receberam inóculos de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, sendo seis tratados com dose única de meropenem 30 mg/kg administrada uma hora após a indução da sepsse. Vinte animais receberam inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e 10 foram imediatamente tratados com 50 mg/kg de meropenem a cada oito horas por 24 horas (três doses). Os animais foram distribuídos homogênea em termos de peso e sexo entre os grupos controle e de tratamento.

Avaliação do desfecho

A resposta ao inóculo e ao tratamento foram avaliados através da taxa de letalidade, tempo de sobrevida, positividade de hemoculturas e de culturas quantitativas de líquido peritoneal. Os animais que não apresentaram sepsse letal após 24 h, sofreram eutanásia com doses letais de xilazina e quetamina.

Hemoculturas (0,5-1 ml) foram coletadas através de punção intracardiaca após o óbito e incubadas em meio "brain heart infusion". O líquido peritoneal foi obtido após laparotomia e injeção de 5 ml de solução salina isotônica, homogeneização e aspiração. Um microlitro deste aspirado foi semeado em agar McConkey para culturas quantitativas. Além disso, culturas quantitativas foram realizadas após diluição de 1:100 do aspirado e semeadura de 1µL em ágar McConkey.

Análise estatística

Variáveis contínuas foram descritas como média e desvio-padrão e frequências como porcentagens. Variáveis categóricas foram comparadas através do teste de Mann-Whitney. Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a sobrevida dos grupos sem tratamento. Foi utilizado o nível de significância de 0,05. Os dados foram computados em Excel (Microsoft, New York, USA) e a análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, USA). Gráficos e análise estatística pelo teste de Mann-Whitney foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, USA).

RESULTADOS

Soluções de *K. pneumoniae* ESBL com concentrações de $1,5 \times 10^9$ a $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram avaliadas em termos de promoção de letalidade em ratos Wistar adultos e observou-se que inóculos com $1,5 \times 10^9$ UFC/ml e $6,0 \times 10^9$ UFC/ml não eram letais em seis (100%) e quatro (80%) dos animais respectivamente submetidos à estas concentrações de microorganismos. Inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em oito (80%) dos animais. Soluções de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em 10 (100%) ratos (Figura 1).

Seis dos 12 que receberam inóculos de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados com dose única de 30 mg/kg após uma hora da indução da sepsse e a mortalidade foi de 83,3% (cinco de seis ratos) no grupo que recebeu tratamento e de 100% no controle sem tratamento. No grupo de 20 animais inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, 10 foram tratados imediatamente com 50 mg/kg de meropenem a cada oito horas por 24 horas e observou-se que quatro (40%) dos tratados e oito (80%) dos controles evoluíram para óbito ($p=0.042$, Figura 2).

Culturas quantitativas de fluido peritoneal realizadas no grupo de ratos inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml apresentaram 10^4 UFC/ml ou menos para nos animais tratados e acima de 10^5 UFC/ml nos controles ($p=0.001$). Enquanto que no grupo de ratos inoculados com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, as culturas quantitativas de fluido peritoneal apresentavam contagens de colônias acima de 10^5 UFC/ml independente do tratamento (Figura 3).

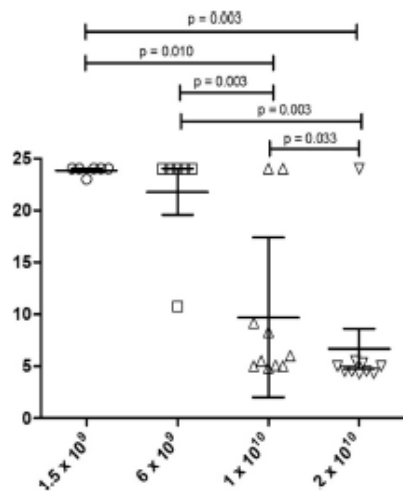


FIGURA 1 – tempo de sobrevivência, em horas, dos animais não tratados de acordo com a concentração do inóculo administrado (UFC/ml).

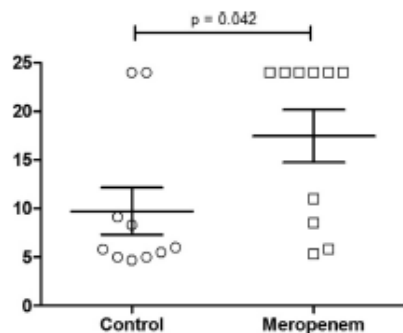


FIGURA 2 – Tempo de sobrevivência (horas) após a injeção de solução de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml em animais sem tratamento (controles) e nos tratados imediatamente com 50mg/kg de meropenem.

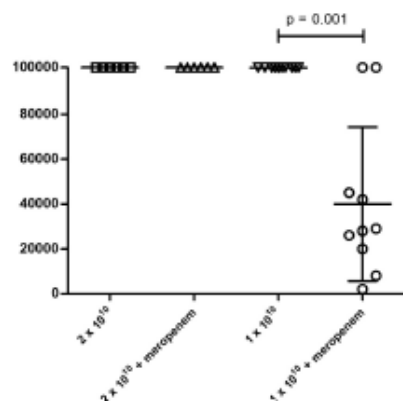


FIGURA 3 – Culturas quantitativas de fluido peritoneal em UFC/ml nos animais não tratados e tratados que receberam respectivamente soluções com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e tratamento com 30mg/kg de meropenem em dose única e soluções de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e tratamento com 50mg/kg de meropenem em 3 doses.

DISCUSSÃO

Estudos prévios descreveram modelos experimentais de inóculos para sepse peritoneal de enterobactérias não *K. pneumoniae*^{2,5,13}. Modelos de infecção de partes moles em ratos neutropênicos foram realizados com inóculos pouco concentrados para avaliar dados microbiológicos e não a mortalidade relacionada ao tratamento antimicrobiano⁸. Este estudo descreve a padronização para atingir um modelo de sepse letal por *K. pneumoniae* ESBL, passível de tratamento para avaliar a resposta ao antimicrobiano em ratos imunocompetentes.

Inóculos com concentrações de 10^8 e 10^9 UFC/ml promovem sepse não letal em ratos imunocompetentes. Sepse induzida por soluções nestas concentrações, pode ser útil para estratificar dose de antimicrobianos e comparar a eficácia antimicrobiana através de resultados microbiológicos, mas não permite avaliar o desfecho em termos de sobrevivência. Inóculos concentrados excessivamente promovem sepse letal, porém não permitem avaliar diferenças de mortalidade e de culturas quantitativas entre animais tratados e controles. No presente estudo, observou-se que a concentração de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml nos inóculos foi excessiva em termos de observar diferenças de sobrevivência e culturas quantitativas.

Inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, aferidos acuradamente por espectrofotometria produziram sepse letal passível de ser tratada imediatamente após a indução da sepse, com antibioticoterapia por 24 horas. Tal modelo permitiu comparar sobrevivência e dados microbiológicos de animais tratados e controles. Indaga-se se a administração imediata de antimicrobianos poderia reduzir a carga bacteriana do inóculo; porém, observou-se a positividade de culturas apesar desta técnica e além disso, a mesma baseou-se em outros modelos prévios^{2,5}.

Este estudo valida um modelo experimental de sepse induzindo peritonite letal entre seis e 24 horas. O modelo possibilita a avaliação da eficácia antimicrobiana através de hemoculturas, culturas quantitativas e sobrevivência dos animais.

CONCLUSÃO

O modelo experimental com inóculo de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml submetido ao tratamento imediato e por 24 horas foi capaz de avaliar resposta microbiológica e de sobrevivência podendo ser modelo de embasamento e de controle para tratamento de sepse letal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às técnicas Maria da Luz Pereira e Marilene Terezinha Barbosa e ao professor Daniel Fernandes do biotério da UEPG. Agradecem também aos professores Carmen Sanches Ito e Carlos Alberto Lima Utrabo, do Departamento de Medicina da UEPG respectivamente pelo auxílio com os cálculos nas diluições e padronização das culturas quantitativas e pela disponibilização do laboratório de técnica operatória para a execução do modelo experimental. Finalmente agradecem a bioquímica Lavinia Arend do Laboratório Central do Estado do Paraná pelo auxílio com a cepa padrão de ATCC e pelas opiniões na validação do inóculo.

REFERÊNCIAS

1. Bosscha K, Nieuwenhuijs VB, Gooszen AW, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verweij WR, Akkermans L M. A standardised and reproducible model of intraabdominal infection and abscess formation in rats. *Eur J Surg* 2000; 166: 963-967.
2. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Mocchegiani F, Fineo A, Orlando F, Del Prete MS, Rocchi M, Saba V, Scalise G. Single-dose intraperitoneal magainins improve survival in a gram-negative-pathogen septic shock rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 101-104.
3. Davis SD. Activity of gentamicin, tobramycin, polymyxin B, and colistimethate in mouse protection tests with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8: 50-53.
4. Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Pulse ME, Weiss WJ, Bonomo RA. Evaluation of ceftazidime and NX1104 in two murine models of infection due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 82-85.
5. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Paggi AM, Orlando F, Kamysz W, Kasprzykowski F, Mackiewicz Z, Scalise G, Saba V. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 193-196.
6. Housman ST, Keel RA, Crandon JL, Williams G, Nicolau DP. Efficacy of human simulated exposures of ceftaroline against phenotypically diverse Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2576-2580.
7. Kesteman AS, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4740-4748.
8. Maglio D, Banevicius MA, Sutherland C, Babalola C, Nightingale CH, Nicolau DP. Pharmacodynamic profile of ertapenem against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a murine thigh model. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 276-280.
9. Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Padoin C, Louchahi K, Petitjean O, Nordmann P. Efficacies of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 885-890.
10. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2108-2113.
11. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 943-950.
12. Tuon FF1, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, Penteado-Filho SR, Pilonetto M, Zavascki AP. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Braz J Infect Dis* 2012; 16: 416-419.
13. Wandall DA, Arpi M, Wandall JH. A rat model of non-lethal bacterial infection. *APMIS* 1997; 105: 187-191.

ANEXO III – SUB-ESTUDO DE SEPSE NÃO LETAL PARA VERIFICAÇÃO DAS DOSES DE ANTIMICROBIANOS

BRAZ J INFECT DIS. 2014;18(5):574-575



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Letter to the editor

Efficacy of tigecycline, polymyxin, gentamicin, meropenem and associations in experimental *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* non-lethal sepsis



Dear Editor,

Retrospective clinical data suggest that antibiotic combinations, including tigecycline (TIG) and polymyxin (POL), result in better outcomes than monotherapy against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP).¹ An *in vitro* study with time-kill assay has shown that TIG, POL and meropenem (MPN) as single agents do not exhibit efficient bactericidal activity against most of the KPC-producing strains, and TIG alone might be a therapeutic option for infections caused by KPC-producers when bacteriostatic activity is adequate, or combined with POL when bactericidal activity is required. The TIG and MPN association was neither synergistic nor bactericidal against KPC-KP strains, suggesting an antagonist effect, as demonstrated by Pournasara et al. in a previous publication in the IJAA.² Additional *in vivo* tests are warranted to better assess killing kinetics of TIG in combination with other antibiotics against KPC-producers.

After approval by the local Ethics Committee for Animal Experimentation, a non-lethal experimental murine model of KPC-KP sepsis was conducted, aiming to observe the effect of different monotherapies and antimicrobial combinations on blood cultures and quantitative peritoneal cultures. Thirty-six rats were inoculated with a low dose inoculum (9×10^8 CFU/mL) of a KPC-KP. MPN minimal inhibitory concentration (MIC) was above 16 μ g/mL, but the strain was susceptible to TIG (MIC = 1 μ g/mL), POL B (MIC < 0.5 μ g/mL) and gentamicin (MIC = 4 μ g/mL). Antibiotic dosages and combinations are described in Table 1. Dosages were the same in combined and monotherapy groups. A control group without antibiotic was included.

No differences were observed in untreated controls and animals treated with MPN, since both groups had positive blood cultures and peritoneal fluid cultures with 10^3 – 10^8 colony-forming units/mL (CFU/mL). All animals treated with TIG, GEN and POL as monotherapy had negative blood cultures, as did the animals treated with POL plus

GEN, POL plus TIG, TIG plus GEN and triple therapy. Those groups also presented negative peritoneal fluid cultures, except for two animals treated with TIG monotherapy, who had 10^3 CFU/mL in peritoneal fluid cultures. When POL and TIG were combined with MPN, three out of six blood cultures turned out positive after 12 h of incubation, a worse microbiological result than monotherapies with TIG, POL and GEN and other combinations.

All monotherapies with TIG, POL and GEN (total $n=9$) showed higher efficacy in sterilizing peritoneal and blood cultures than the group of untreated controls and animals treated with MPN ($n=6$) ($p=0.011$). Triple therapy (MPN+TIG+POL) and double therapies with no MPN (TIG+POL, TIG+GEN, POL+GEN) (total $n=12$) were significantly more effective than controls (untreated controls and animals treated with MPN alone) in sterilizing cultures ($p=0.011$). On the other hand, when the TIG+MPN and POL+MPN combinations ($n=6$) were compared to untreated controls and animals receiving MPN ($n=6$), there were no significant differences in culture positivity ($p=0.275$).

This finding must be confirmed with larger samples, but these data suggest that combinations of MPN with TIG or POL might have an antagonist effect *in vivo*.

As previously reported by Pournasara, 2011, MPN plus TIG was non-synergistic in this *in vivo* experiment. Additionally, POL plus MPN or TIG plus MPN associations may be less effective than monotherapies or other combinations to treat KPC-KP sepsis.

Antibiotic associations should be cautiously used, even for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. *In vitro* studies showing this paradox or antagonist effects used empirical combination therapies in humans with infections by KPC-KP. An experimental study with concentrated inoculum aiming to evaluate the effect of antimicrobial combination in lethal sepsis is ongoing and may elucidate this subject. Clinical trials could answer those questions, but, until then, the combined therapy for synergistic effect of carbapenems and

Table 1 - Experimental study with non-lethal sepsis in rats by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Monotherapy was compared with antibiotic combinations. Meropenem combined with other antibiotics besides having no benefit, positive cultures suggest an antagonistic effect.

Rats	Positive blood culture	>10 ³ CFU/mL in peritoneal fluid culture
No antibiotics	100%	100%
Meropenem	100%	100%
Gentamicin	0	0
Tigecycline	0	67%
Polymyxin B	0	0
Polymyxin B + tigecycline	0	0
Gentamicin + tigecycline	0	0
Polymyxin B + gentamicin	0	0
Gentamicin + meropenem	0	0
Polymyxin B + meropenem	67%	0
Tigecycline + meropenem	33%	0
Polymyxin B + tigecycline + meropenem	0	0

CFU/mL, colony-forming units per milliliter.

other classes of antimicrobials is not recommended, at least for strains with higher MPN MIC.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

Authors acknowledge the staff of Animal Laboratory of Universidade Estadual de Ponta Grossa.

REFERENCES

1. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case

series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:32.

2. Pournarasa S, Vrioni G, Neou E, 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;37:244-7.

Paula Virginia Michelin Toledo ^{a,b,*}

^a Medicine Department, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Internal Medicine Postgraduate Programme, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Felipe Francisco Tuon ^{a,b,c}

^a Medicine Department, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Division of Infectious Diseases, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Internal Medicine Postgraduate Programme, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Lavinia Arend

Bacteriology Section, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado LACEN, PR, Brazil

Ayrton Alves Aranha Junior ^{a,b}

^a Medicine Department, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Surgery Postgraduate Programme, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

* Corresponding author at: Rua Mamoré, 981 L1, 80810-080, Brazil.

E-mail address: paulavmtoledo@yahoo.com.br (P.V.M. Toledo).

Received 15 April 2014

Accepted 12 May 2014

Available online 5 June 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.05.003>

1413-8670/© 2014 Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

ANEXO IV – RESULTADOS DOS ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO DA COMPARAÇÃO ENTRE MONOTERAPIAS E ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS EM SEPSE LETAL POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUTORA DE CARBAPENEMASE



Activity of Antimicrobial Combinations against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Rat Model and Time-Kill Assay

Paula Virginia Michelson Toledo,^{a,b} Ayrton Alves Aranha Junior,^{b,c} Lavinia Nery Arend,^d Vanessa Ribeiro,^e Alexandre Prehn Zavascki,^e Felipe Francisco Tuon^{a,f}

Internal Medicine Postgraduate Training, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil^a; Medicine Department, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil^b; Anatomy Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil^c; Bacteriology Section, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado LACEN-PR, Curitiba, Brazil^d; Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil^e; Division of Infectious and Parasitic Diseases, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, Brazil^f

This study evaluated the efficacy of tigecycline (TIG), polymyxin B (PMB), and meropenem (MER) in 80 rats challenged with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* infection. A time-kill assay was performed with the same strain. Triple therapy and PMB+TIG were synergistic, promoted 100% survival, and produced negative peritoneal cultures, while MER+TIG showed lower survival and higher culture positivity than other regimens ($P = 0.018$) and was antagonistic. *In vivo* and *in vitro* studies showed that combined regimens, except MER+TIG, were more effective than monotherapies for this KPC-producing strain.

Infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* are associated with therapeutic failure and increased mortality (1–5). It has been suggested that antibiotic combination might be a better alternative compared to monotherapy for treatment of KPC-producing isolates (4–9); however, further investigation on this therapeutic strategy is required (10, 11).

In the present study, we evaluated the efficacy of regimens for a KPC-producing *K. pneumoniae* strain in an experimental model of systemic infection and in a time-kill assay (TKA).

A KPC-producing *K. pneumoniae* strain, coded RM-1209, was isolated from a patient's blood and identified by Vitek 2 (bioMérieux, Craponne, France) in 2012. Antibiotic MICs were determined by agar dilution and interpreted according to CLSI and EUCAST for tigecycline (TIG) (12, 13). The strain presented MICs of >32 mg/liter, 1 mg/liter, and 0.5 mg/liter for meropenem (MER), tigecycline, and polymyxin B (PMB), respectively. Detection of the *bla*_{KPC} gene was performed with BigDye v1.1 Sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and KPC-2 was confirmed at databases queried by NCBI BLAST (6).

The study was approved by the ethical committee, according to the Protocol for the Protection and Welfare of Animals (European Union). The animal model has been previously described (13). In brief, male and female immunocompetent Wistar rats weighing between 190 and 300 g were randomized into each treatment group. Absence of immunosuppression demanded administration of highly concentrated inoculums with 1.5×10^{10} CFU/ml. This solution, when diluted 1:20 presents an absorbance of 0.546 at 625 nm wavelength on spectrophotometry (corresponding to tube 50 of nephelometric scale). Seven groups of 10 rats were treated with the following regimens: MER, TIG, PMB, MER+PMB, MER+TIG, PMB+TIG, or PMB+MER+TIG. Ten rats were untreated (control group). The sample size (80 rats) was calculated using the formula $n = z^2PQ/d^2$ based on the expected proportion of deaths (50%) and 8% standard error with an 80% statistical power.

Animals were injected with a 0.7-ml intraperitoneal aliquot of 1.5×10^{10} CFU/ml KPC-producing *K. pneumoniae* inoculum in

the log growth state (14). After infection, rats received antimicrobials intraperitoneally, TIG (Tygacil) at 7 mg/kg of body weight every 12 h (15, 16), PMB (polymyxin B) at 2 mg/kg every 12 h (17, 18), or MER (Meronem) at 50 mg/kg every 8 h (19), or they remained untreated. No pharmacokinetic (PK) data were obtained. Length of survival was observed for 24 h, and euthanasia was performed on rats surviving at 24 h. Blood samples were collected by aseptic cardiac puncture, and peritoneal fluid samples were obtained through direct observation after incision by an aseptic technique. Blood samples were incubated in broth, and peritoneal fluid was incubated on MacConkey agar plates for quantitative cultures with a 1- μ l loop.

In vitro TKA was performed by inoculating 5×10^6 CFU/ml of the clinical strain into 10 ml of fresh cation-adjusted Mueller-Hinton broth (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) and incubating it at 35°C. MER at 4 mg/liter, TIG at 1 mg/liter, and PMB at 0.25 mg/liter were tested alone and in the same combinations performed *in vivo*. Aliquots were removed at 1, 6, 12, and 24 h after inoculation. Samples were serially diluted (10^{-1} to 10^{-8}) and plated in duplicate on blood agar plates for colony count. Antimicrobial carryover was controlled by streaking the transferred aliquot over the agar plate and observing possible inhibition of growth at the site of the initial streak. Potential *in vitro* MER hydrolysis was not assessed.

Time-kill curves were constructed by plotting mean colony

Received 8 February 2015. Returned for modification 16 March 2015.

Accepted 10 April 2015.

Accepted manuscript posted online 20 April 2015.

Citation Toledo PVM, Aranha Junior AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP, Tuon FF. 2015. Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a rat model and time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4301–4304. doi:10.1128/AAC.00323-15.

Address correspondence to Paula Virginia Michelson Toledo, paulavmtoledo@yahoo.com.br.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00323-15

Toledo et al.

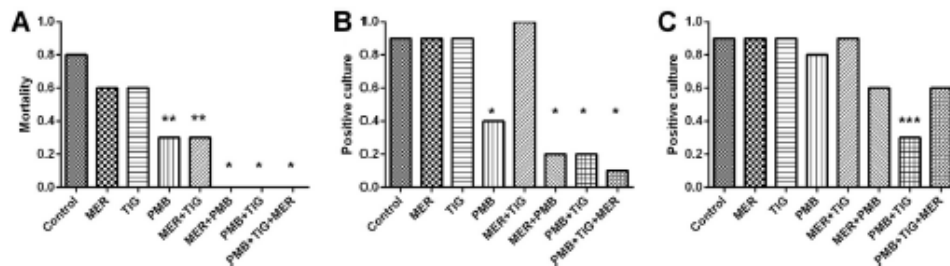


FIG 1 Animal model of sepsis of KPC-2-producing *K. pneumoniae* and effects of different antibiotic combinations. (A) Mortality (*, $P < 0.05$ compared with PMB, MER+TIG, MER, TIG, and control; **, $P < 0.05$ compared with control); (B) peritoneal culture (*, $P < 0.05$ compared with control, MER, TIG, and MER+TIG); (C) blood culture (***, $P < 0.05$ compared with control, MER, TIG, and MER+TIG).

counts versus time. The results were interpreted after 24 h of incubation.

Survival curves were constructed, and a Gehan-Breslow-Wilcoxon test was performed. Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests evaluated differences in blood, peritoneal cultures, and mortality between groups. Alpha adjustment was performed with Dunn's multiple comparison tests. SPSS 16 (IBM, Armonk, NY, USA) software was used for statistical analysis, and Prism (Graph-Pad, La Jolla, CA) was used for graph construction. A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

In Kaplan-Meier survival curves, untreated rats presented with 80% mortality, a proportion similar to that of rats treated with TIG and MER monotherapies, whose mortality was 60.0% in the two groups ($P = 0.061$ and $P = 0.114$). All animals treated with combinations including PMB survived (PMB+TIG, PMB+TIG+MER, PMB+MER), whereas a 70.0% survival rate was observed with MER+TIG ($P = 0.018$). The MER+TIG combination did not produce significantly different survival from PMB monotherapy ($P = 0.901$) (Fig. 1A and 2).

PMB monotherapy and combinations including PMB significantly sterilized more peritoneal cultures than MER+TIG ($P =$

0.001) (Fig. 1B). The PMB+TIG combination determined the lowest positivity of the blood cultures, statistically significantly different from the control, MER, TIG, and MER+TIG groups ($P < 0.001$) (Fig. 1C).

The PMB+TIG combination and triple therapy were synergistic, whereas MER+TIG showed an antagonistic effect in the TKA (Fig. 3).

Evaluating survival and overall culture sterilization, better performance occurred with PMB+TIG, followed by triple therapy, PMB+MER, and PMB. Monotherapies did not present the same efficacy observed in the better performing combinations, PMB+TIG and PMB+TIG+MER, corroborating previous studies, which observed lowered mortality with antimicrobial combinations (4–9).

It has been previously described, in retrospective data, that triple therapy might lower mortality in patients infected with KPC-producing *K. pneumoniae*; however, the MER MIC was not mentioned (4). In the present study, triple therapy was not superior to PMB+TIG; however, this finding should be confirmed using a lower MER MIC strain.

Moreover, the combination of PMB+MER demonstrated an impact on survival and peritoneal cultures but was not superior to PMB monotherapy for treating bacteremia. Despite the lower mortality observed with the PMB+MER combination, no synergism was observed with PMB+MER in the TKA.

Of interest, we found an antagonistic effect of TIG+MER, which caused worse outcomes than PMB monotherapy, as previously suggested by our group (20). Pournaras et al. also showed that MER+TIG is not synergistic *in vitro* (21). Previous studies of nonlethal and nonsystemic infections were discordant about the antagonistic effects of TIG+MER *in vivo* (20, 22) and *in vitro* (23). Further investigation using this combination is required, but we believe that TIG+MER should be used with caution for treatment of infections due to KPC-producing isolates. On the contrary, the activity of TIG+PMB showed favorable results in our study, corroborating previous *in vitro* (21) and *in vivo* (24) findings. Tetracycline monotherapy did not perform better than MER alone, potentially because of a bacteriostatic effect and inadequate PK for the treatment of bloodstream infections, where TIG should be avoided (25).

A strength of this study is that the *in vivo* and *in vitro* experiments showed similar findings of antimicrobial activity and sample size with an adequate statistical power to detect relevant dif-

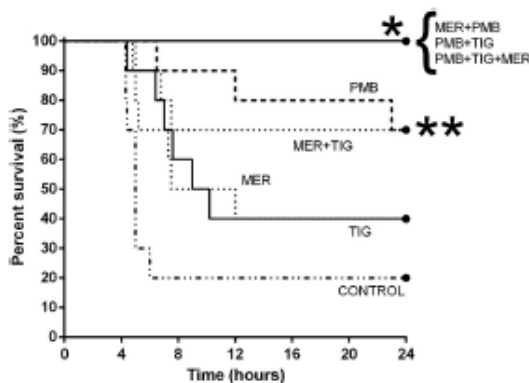


FIG 2 Survival curves of a rat model of sepsis infected with KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and response to treatment by antibiotic combinations or monotherapies. *, P value of < 0.05 compared with other groups; **, P value of < 0.05 compared with control.

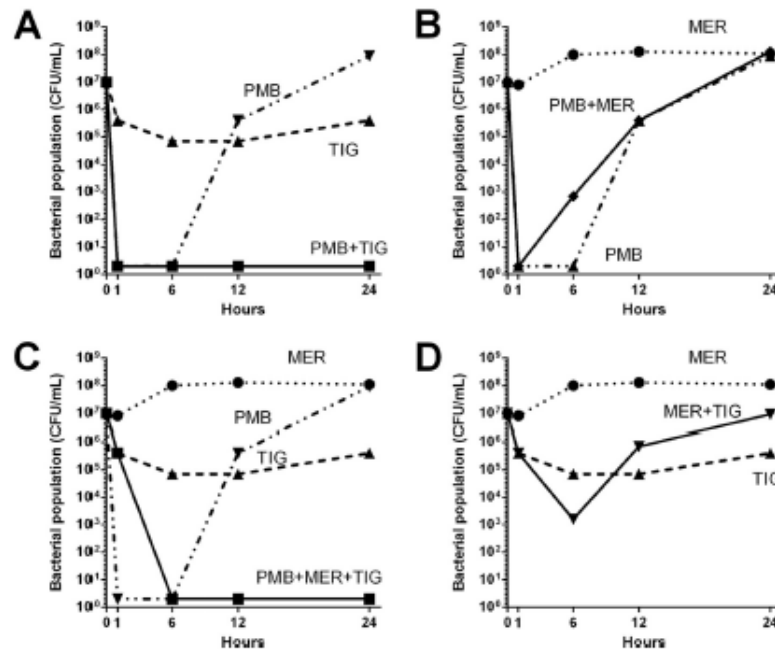


FIG 3 Time-kill assay of KPC-2-producing *K. pneumoniae* using antibiotic combinations: (A) PMB+TIG; (B) PMB+MER; (C) PMB+MER+TIG; (D) MER+TIG. Bactericidal activity was defined as a ≥ 3 -log₁₀ reduction in the total number of CFU per milliliter from the original inoculum at 24 h; bacteriostatic activity was defined as a < 3 -log₁₀ reduction in the total number of CFU per milliliter from the original inoculum at 24 h; synergism was defined as a difference of ≥ 2 log₁₀ in the reduction of the number of CFU per milliliter between the combination and the most active agent at 24 h; antagonism was defined as a ≥ 2 -log₁₀ increase of the number of CFU per milliliter between the combination and the most active agent at 24 h.

ferences in clinical and microbiological outcomes. A limitation of the present study was the evaluation of only one strain, as differences among strains can affect study results despite similar MICs (26). We also did not perform a PK evaluation of the antibiotics in rats, which might contribute to the interpretation of our findings (15, 17–19), but previous *in vitro* studies have demonstrated that combinations of TIG and MER and TIG and PMB present favorable PK results (27, 28).

In summary, a combined regimen including PMB resulted in improved outcomes in this experimental study. Triple therapy was not superior to dual combinations with PMB. *In vitro* antagonism of TIG+MER was correlated with similar outcomes and resulted in worse microbiological findings compared to MER, TIG, and PMB monotherapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the staff from Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

P.V.M.T. received funding from the Ministério da Educação e Cultura (MEC) through Internal Medicine Postgraduate Training, Universidade Federal do Paraná, Brazil. F.F.T. received grants from Pfizer and Astra-Zeneca.

REFERENCES

1. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9:228–236. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).

- Toledo PV, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhn KR, Working Group in Healthcare Associated Infections. 2012. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect* 80:351–353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.01.010>.
- Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. 2009. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:1180–1185. <http://dx.doi.org/10.1086/648451>.
- Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumbarello F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Canda R, Bassetti M. 2012. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 55:943–950. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis588>.
- Hirsch EB, Tam VH. 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 65:1119–1125. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq108>.
- Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, Penteado-Filho SR, Pilonetto M, Zavascki AP. 2012. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Braz J Infect Dis* 16:416–419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.006>.
- Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Dol Y. 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2108–2113. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06268-11>.
- Dalkos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychoglou M, Argyropoulou A, Stefanou I, Sypsa V, Miriagou V, Nepka M, Georgiadiou S, Markogiannakis A, Goukos D, Skoutelis A. 2014. Carbapen-

Toledo et al.

- emase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2322–2328. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02166-13>.
9. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, Prekates A, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. 2011. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 17:1798–1803. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03514.x>.
 10. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. 2013. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:1333–1353. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2013.845523>.
 11. Paul M, Carmeli Y, Durante-Mangoni E, Mouton JW, Tacconelli E, Theuretzbacher U, Musini C, Leibovici L. 2014. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 69:2305–2309. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku168>.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 13. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Helsing P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19:141–160. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>.
 14. Toledo PV, Tuon FF, Bail L, Manente F, Arruda P, Aranha-Junior AA. 2014. Experimental model for treatment of extended spectrum betalactamase producing-*Klebsiella pneumoniae*. *Arq Bras Cir Dig* 27:168–171. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202014000300002>.
 15. Murphy TM, Deltz JM, Petersen PJ, Mikels SM, Weiss WJ. 2000. Therapeutic efficacy of GAR-936, a novel glycolcycline, in a rat model of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3022–3027. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.11.3022-3027.2000>.
 16. Nannini EC, Pal SR, Singh KV, Murray BE. 2003. Activity of tigecycline (GAR-936), a novel glycolcycline, against enterococci in the mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 47:529–532. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.2.529-532.2003>.
 17. Abdelraouf K, He J, Ledesma KR, Hu M, Tam VH. 2012. Pharmacokinetics and renal disposition of polymyxin B in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5724–5727. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01333-12>.
 18. Chang YL, Chou MH, Lin MF, Chen CF, Tsal TH. 2002. Determination and pharmacokinetic study of meropenem in rat bile using on-line microdialysis and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 961:119–124. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00078-X).
 19. Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Padoin C, Louchahi K, Petitjean O, Nordmann P. 2000. Efficacies of imipenem, meropenem, ceftipime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:885–890. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.4.885-890.2000>.
 20. Toledo PV, Tuon FF, Arend L, Aranha Junior AA. 2014. Efficacy of tigecycline, polymyxin, gentamicin, meropenem and associations in experimental *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* non-lethal sepsis. *Braz J Infect Dis* 18:574–575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.05.003>.
 21. Pourmaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. 2011. 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* 37:244–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.10.031>.
 22. Michall G, Labrou M, Pitiriga V, Manousaka S, Sakellaridis N, Tsakris A, Pourmaras 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. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00891-13>.
 23. Entenza JM, Moreillon P. 2009. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of *in vitro*, animal and case report studies. *Int J Antimicrob Agents* 34:8.e1–8.e9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.11.006>.
 24. Cobo J, Morosini MI, Pintado V, Tato M, Samaranch N, Baquero F, Canton R. 2008. Use of tigecycline for the treatment of prolonged bacteremia due to a multiresistant VIM-1 and SHV-12 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60:319–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.017>.
 25. Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. 2011. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 66:1963–1971. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr242>.
 26. Sanchez-Romero MA, Casadesus J. 2014. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:355–360. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1316084111>.
 27. Wiskirchen DE, Koomanachal P, Nicastro AM, Nicolau DP, Kuti JL. 2011. *In vitro* pharmacodynamics of simulated pulmonary exposures of tigecycline alone and in combination against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a KPC carbapenemase. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1420–1427. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01253-10>.
 28. Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL. 2014. *In vitro* pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:874–879. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01624-13>.