

Avaliação da Terapia Combinada de Antimicrobianos *in vitro* e *in vivo* em macrocolônias de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1

Luana Boff, Alexandre J. Macedo

Laboratório, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Introdução

De acordo com a Organização da Saúde (OMS), membros da família Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos (ERC) devem ser priorizados na procura por um tratamento efetivo. As infecções causadas pelas bactérias dessa família apresentam alta mortalidade e os tratamentos disponíveis são limitados, visto que, essas possuem resistência intrínseca a diferentes classes de antimicrobianos, além dos carbapenêmicos. Combinações de dois ou mais antimicrobianos vem se tornando uma alternativa a ser estudada afim de encontrar uma solução para o problema.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de três antimicrobianos (meropenem, polimixina B e rifampicina), separadamente e em conjunto, para tratar infecções de cepa de *E. hormaechei* resistente aos carbapenêmicos *in vitro* e *in vivo* através do modelo *Galleria mellonella*.

Materiais e Métodos

O isolado clínico (798) de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtor de NDM-1 foi obtido de amostra de urina de hospital de Porto Alegre - RS. O ensaio de biofilme macrocolônia em que as regiões estudadas foram originadas, Figura 1, foi realizado em trabalho prévio sobre a atividade de biofilme desse isolado.

A concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos meropenem, polimixina B e rifampicina foi determinada de acordo com o CLSI. O método de Checkerboard foi utilizado para testar o sinergismo entre os antimicrobianos selecionados. O tratamento *in vivo* foi feito através do modelo invertebrado de *G. mellonella*.

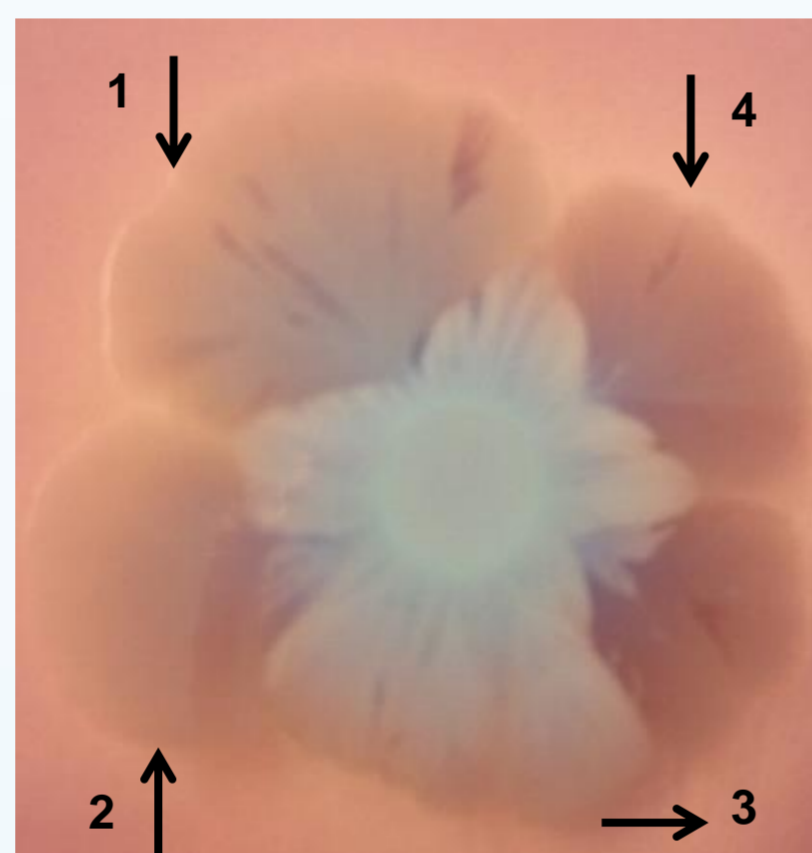


Figura 1. A partir do isolado clínico 798 foram obtidas diferentes regiões morfológicas apontadas na figura as quais foram identificadas como 798-1, 798-2, 798-3 e 798-4. Técnica de crescimento macrocolônia com meio LB + Congo Red após 5 dias de incubação a 37° C.

Resultados e Discussão

De acordo com os resultado da MIC, todas as regiões foram resistentes ao meropenem (MER) e apresentaram altos valores de MIC (128 mg/L) para rifampicina (RIF). Entretanto, todas as regiões foram suscetíveis à polimixina B (POL), como mostra o tabela 1.

Na tabela 1 também estão os resultados de checkerboard onde foi possível verificar que só a combinação dos três antimicrobianos foi sinérgica contra todas as regiões testadas. Apesar disso, mesmo em combinações não sinérgicas, todos os antimicrobianos tiveram suas MICs parciais diminuídas quando utilizados em conjunto, mesmo não apresentando sinergismo. Por exemplo para 798-4, MER utilizado em conjunto com POL foi capaz de diminuir a MIC individual de MER em 16 vezes e a de POL na metade. Essa combinação não mostrou sinergismo através do cálculo da técnica utilizada, porém ainda pode ser clinicamente relevante pela diminuição na MIC.

A combinação de três antimicrobianos que atuem de diferentes maneiras para lisar a célula bacteriana foi a que mostrou maior potencial *in vitro* e por isso foi escolhida para ensaio de tratamento *in vivo*.

Tabela 1. Resultados de MIC e checkerboard com os antimicrobianos meropenem, polimixina B e rifampicina contra 798 e suas regiões provenientes da macrocolônia de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtora de NDM-1.

	MIC (mg/L)			Checkerboard (mg/L)			
	MER	POL	RIF	MER/POL	MER/RIF	POL/RIF	MER/POL/RIF
798-1	32 (R)	2 (S)	128	4/0.5 (SE)	2/8 (SE)	1/64 (NI)	2/0.25/4(SE)
798-2	32 (R)	1 (S)	128	8/0.5 (NI)	0.5/64 (NI)	1/1 (NI)	1/0.25/4 (SE)
798-3	16 (R)	1 (S)	128	4/0.5 (NI)	1/64 (NI)	0.5/64 (NI)	1/0.25/4 (SE)
798-4	16 (R)	1 (S)	128	1/1 (NI)	2/64 (NI)	0.5/64 (NI)	1/0.25/4 (SE)

MIC: concentração inibitória mínima; MER: meropenem; POL: polimixina B; RIF: rifampicina; R: resistência; S: susceptibilidade; SE: efeito sinérgico; NI: sem interação. MER resistente > 8mg/L e POL resistente > 4 mg/L de acordo com CLSI. Não há ponto de corte para RIF.

O inóculo bacteriano injetado nas larvas foi de 1.0×10^7 UFC/larva, de acordo com dados aqui não mostrados, essa é a concentração ótima para a bactéria testada matar, aproximadamente, 80% das larvas nas 120 horas de incubação em que são observadas. Todas as regiões testadas foram capazes de matar as larvas nesta concentração, porém a região 798-1 e a região 798-4 foram a menos e mais virulenta, respectivamente. Por isso foram escolhidas para o ensaio *in vivo*. Escolhidas as regiões, a concentração de bactéria e os antimicrobianos em monoterapia e em combinação tripla (RIF+POL+MER) foi realizado o ensaio *in vivo*, onde larvas do invertebrado *Galleria mellonella* foram infectadas e tratadas (uma vez 30 min após infecção) em um ensaio de sobrevivência/tempo.

Para a região menos virulenta (30% de sobrevivência após 120h de incubação), 798-1, a combinação tripla e a monoterapia com MER, POL e RIF não mostraram diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratado (gráfico 1A). Já para a região mais virulenta (16,7% de sobrevivência), 798-4, a combinação tripla e a monoterapia com MER foram significativamente mais efetivos do que o grupo controle (gráfico 1B).

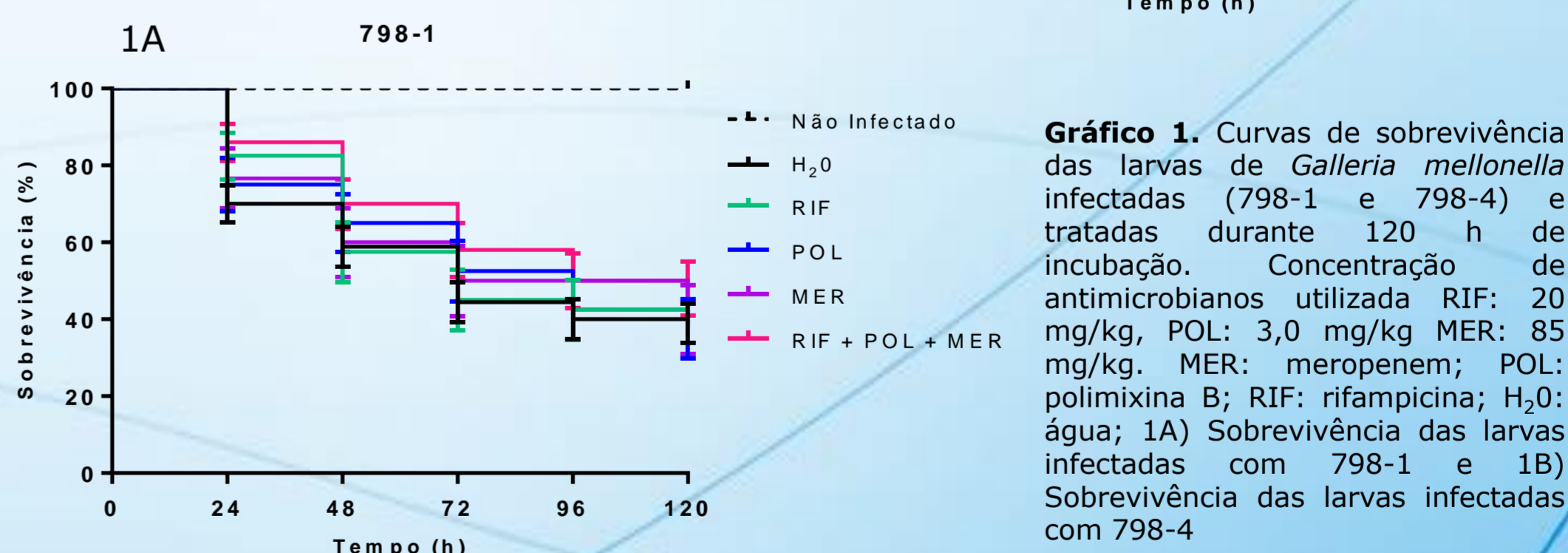


Gráfico 1. Curvas de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas (798-1 e 798-4) e tratadas durante 120 h de incubação. Concentração de antimicrobianos utilizada RIF: 20 mg/kg, POL: 3,0 mg/kg MER: 85 mg/kg. MER: meropenem; POL: polimixina B; RIF: rifampicina; H₂O: água; 1A) Sobrevivência das larvas infectadas com 798-1 e 1B) Sobrevivência das larvas infectadas com 798-4

Conclusão

Os estudos apresentados mostraram que em um biofilme macrocolônia diferentes regiões de enterobactérias produtoras de NDM-1 respondem de maneiras distintas às encontradas *in vitro* quando infectando *in vivo* *G. mellonella* e tratadas com uma combinação dos antimicrobianos rifampicina, polimixina B e meropenem. Os resultados lançam luz sobre a possível utilização de terapia combinada para obter sucesso em infecções causadas por bactérias multirresistentes de preocupação mundial e sobre as diferentes respostas a antimicrobianos que podemos encontrar nas regiões de um biofilme. Mais estudos são necessários para maior compreensão dessa utilização na clínica, porém ela mostra ser promissora.