



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO
- FUNDAP

CAROLINA NOGUEIRA GOMES

Avaliação da interação Imipenen e Fosfomicina frente à Klebsiella pneumoniae sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos pelo método “checkerboard”

RIBEIRÃO PRETO

2011



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO
– FUNDAP



CAROLINA NOGUEIRA GOMES

Avaliação da interação Imipenen e Fosfomicina frente à *Klebsiella pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos pelo método “checkerboard”

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP/ Departamento de Departamento de Microbiologia, sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Martinez.

Área: Microbiologia/ Controle de Infecção Hospitalar

Orientador: Prof. Dr. Roberto Martinez.

Supervisora Titular: Rosa Helena A. R. Gironi

RIBEIRÃO PRETO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Carolina Nogueira

Avaliação da interação Imipenen e Fosfomicina frente à *Klebsiella pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos pelo método “checkerboard”. Ribeirão Preto, 2011.

27 p.

Trabalho de Conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional/SES, área de Microbiologia Clínica e de Infecção Hospitalar, Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

Orientador: Martinez, Roberto.

1. *Klebsiella pneumoniae*.
2. KPC.
3. Imipenem.
4. Fosfomicina.
5. Checkerboard

Dedicatória

**“Dedico este trabalho a familiares, amigos e aos profissionais
do laboratório de microbiologia do HCFMRP”**

Agradecimentos

Professor Doutor Roberto Martinez
pela dedicação, paciência e colaboração

Aos profissionais e amigos do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP
pelo auxílio, colaboração e amizade

Alessandro Ueta

Deise Scheeren

Larissa Gregório

Helen Oliveira

Mariele de Freitas

Natália Augusta de Freitas

Thais Antunes

pelo companheirismo, momentos de descontração e amizade

À minha mãe, Neusa Nogueira Gomes, meu pai Antônio Gomes e minha irmã Carina
Nogueira Gomes
pelo amor, compreensão e apoio.

RESUMO

Nesse trabalho foram analisadas *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes hospitalizados, realizando identificação e antibiograma das espécies pelo sistema de automação Vitek2®, teste de Hodge Modificado para a avaliação da produção da enzima carbapenemase e teste de interação da atividade antimicrobiana do imipenem e fosfomicina pelo método “checkerboard”.

As *K.pneumoniae* (n=50) foram isoladas entre fevereiro e agosto de 2011 de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) de amostras clínicas de urina e sangue. As bactérias com perfil de resistência aos carbapenêmicos (n=36) foram fenotipicamente investigadas quanto à produção de carbapenemase através do teste de Hodge Modificado e 86,2% (n=31) foram positivas. Os isolados de *K. pneumoniae* foram analisados frente a interação das drogas imipenem e fosfomicina pelo método de “checkerboard” e os resultados demonstraram potencial atividade sinérgica tanto nos isolados sensíveis quanto nos resistentes aos carbapenêmicos.

Assim, este estudo envolvendo *K.pneumoniae* carbapenem-resistentes soma conhecimento aos já existentes, podendo orientar novas estratégias para o tratamento de infecções provocadas por estes microrganismos e dessa maneira, contribuir para reduzir o impacto da resistência a antimicrobianos, que é um dos maiores desafios dos microbiologistas e da comunidade científica mundial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. As Enterobacteriaceae	01
1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	01
1.3 Antibióticos Fosfomicina e Imipenem.....	03
1.3.1 Imipenem.....	03
1.3.2 Fosfomicina	04
1.4 Combinações de Antimicrobianos	05
2. OBJETIVO	06
2.1. Objetivo geral	06
2.2 Objetivos específicos.....	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS	06
3.1. Confirmação Fenotípica de Resistência	07
3.1.2 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.	07
3.1.3 Teste de Hogde Modificado.....	07
3.1.4 Avaliação da interação Imipenem e Fosfomicina pelo método checkerboard	08
4. . RESULTADOS E DISCUSSÕES	09
4.1. Teste de Hodge modificado	09
4.2. Avaliação da interação Imipenem e Fosfomicina pelo método checkerboard ..	10
5. CONCLUSÕES	14
6. . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. Introdução

1.1 As Enterobacteriaceae

Os bacilos gram-negativos pertencentes às Enterobacteriaceae constituem as bactérias isoladas com maior frequência em amostras clínicas. Esses microorganismos estão amplamente distribuídos na natureza, são encontrados no solo, na água, em vegetais e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais. Tipicamente, os membros das Enterobacteriaceae produzem colônias secas ou mucóides relativamente grandes, de cor cinza opaco, em Ágar sangue de carneiro; as colônias mucóides sugerem cepas encapsuladas de *Klebsiella pneumoniae*. A hemólise em ágar sangue é variável e não distintiva.

Entretanto, a diferenciação das Enterobacteriaceae baseia-se primariamente na presença ou ausência de várias enzimas codificadas pelo material genético do cromossoma bacteriano. Essas enzimas atuam no metabolismo das bactérias ao longo de diversas vias que podem ser detectadas por técnicas de cultura *in vitro*. Os substratos com os quais essas enzimas podem reagir são incorporados ao meio de cultura, juntamente com um indicador capaz de detectar a utilização do substrato ou a presença de produtos metabólicos específicos. (KONEMAN, 2008).

Nas últimas décadas, as bactérias gram-negativas tem assumido um papel importante nas infecções hospitalares, sendo consideradas um dos principais agentes etiológicos e um problema para a Saúde Pública devido a sua prevalência e altos índices de resistência associados a mortalidade.

Estudos multicêntricos têm mostrado que, em pacientes da unidade de cuidados intensivos na América do Sul, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são os agentes mais prevalentes da família das Enterobacteriaceae sendo descritos como segundo e quarto patógenos mais frequentemente isolados no ano de 2002, respectivamente, seguidos pelo gênero *Enterobacter* (KIFFLER et al., 2005, FLEDER et al., 2006).

1.2 *Klebsiella pneumoniae*

É um dos gêneros bacterianos comumente isolados em casos de infecção hospitalar, como pneumonia, infecção urinária e septicemia, relacionada com as altas taxas de morbimortalidade (LANDMAN, et al., 2007; MEYER, et al., 1993, PEREIRA, et al. 2003). No Brasil, relatos demonstram que de 12,1% - 16,9% das infecções em unidades de cuidados intensivos são causadas por *K. pneumoniae*

(OPLUSTIL et al., 2005; KIFFER et al., 2005) ocupando o quarto lugar na ocorrência de infecções hospitalares.

As infecções hospitalares recidivantes têm como uma das principais causas a resistência bacteriana. A aquisição de mecanismos de resistência tem levado esses microrganismos, principalmente a *Klebsiella pneumoniae* a alcançar notoriedade como patógeno causador de surtos de infecção hospitalar (ARDANUY et al., 1998). Os carbapênemicos são uma classe de antibióticos comumente utilizados para tratar infecções causadas por Enterobacteriaceae multiresistentes. No entanto, um mecanismo cada vez mais comum de resistência é a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (BRADFORD et al., 2004; DESHPANDE et al., 2006; LOMAESTRO, et al. 2006; NAAS et al., 2005; NAVON-VENEZIA, et al., 2006).

A enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é a serinocarapenemase de maior importância. O primeiro relato dessa enzima ocorreu em 2001 nos Estados Unidos, seu nome refere-se a espécie na qual a KPC-1 foi identificada, tempos depois uma variante KPC-2 foi descrita em *Klebsiella sp* e *Salmonella entérica*, porém uma recente correção da sequência da KPC-1 indicou que bla_{KPC-1} e bla_{KPC-2} são idênticas (YIGIT, et al., 2003). Mutações do gene estrutural da enzima KPC-2 tem resultado em três novas variantes que apresentam diferentes perfis de hidrólise (WOLTER et al.; 2008).

A enzima KPC ocorre mais comumente em *K. pneumoniae* mais tem sido relatada esporadicamente em outras espécies de Enterobacteriaceae e confere resistência a todos os agentes β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ALBA et al., 2005; SMITH MOLAND et al., 2003 ; YIGIT, et al., 2003).

Relatos indicam que os determinantes de KPC apresentam uma grande capacidade de disseminação, associada à sua localização plasmidial ou à presença de elementos móveis de resistência. A presença de isolados bacterianos produtores de KPC pode ser clinicamente subestimada, devido a perfis de resistência categorizados como sensíveis na presença do gene bla_{KPC}, o que afeta a sensibilidade de detecção dos métodos convencionais (CLSI, 2009). Na ausência de outro mecanismo que contribua com a resistência aos antibióticos carbapenêmicos, a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados para o antibiótico Imipenem apresenta apenas uma sensibilidade diminuída e, em alguns testes fenotípicos, principalmente nos automatizados, são erroneamente

identificados como ESBL. Essas dificuldades impedem uma boa identificação desse mecanismo o que pode gerar resultados equivocados com conseqüências fatais ao paciente (WALTHER- RASMUSSEN & HOIBY, 2007).

As metodologias usadas para rastreamento de KPC são diversificadas: focalização isoelétrica, disco difusão, E-teste e teste de Hodge modificado. Pode-se ainda pesquisar o gene *blaKPC* por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ribotipagem (BRADFORD et al., 2004; ANDERSON, et al. 2007). Assim, a triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas subclasse III (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona e imipenem (IPM), meropenem (MEM) e ertapenem (ETP), além do teste de Hodge modificado (CLSI, 2009).

O rápido crescimento nas taxas de infecção hospitalar por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tem trazido grandes dificuldades no tratamento dos pacientes, pois são multidroga- resistentes, restando poucas opções terapêuticas.

1.3 Os Antibióticos Fosfomicina e Imipenem

1.3.1 Imipenem

Antibiótico da classe dos carbapenêmicos classificado como β - lactâmico com amplo espectro de atividade e desenvolvido para atender as necessidades médicas na terapia de doenças infecciosas. Assim como todo antibiótico β - lactâmico, os carbapenêmicos agem inibindo a síntese da parede bacteriana pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilina- PBPs. Atuam na fase extra-citoplasmática da síntese da parede bloqueando a transpeptidação ligação covalente das cadeias lineares de fragmentos precursores do peptidoglicano catalisada pelas transpeptidases (PBPs). O antibiótico β - lactâmico é um análogo estereoquímico do seguimento ativo das PBPs, o que torna essas enzimas indisponíveis para o funcionamento, desestruturando a camada de peptidoglicano da célula bacteriana e predispondo a bactéria à lise celular (SAMPAIO, 2007 IN NETTO et al., 2007).

O imipenem possui um amplo espectro de ação *in vitro*, o que inclui atividade contra cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos, e bactérias anaeróbias, com exceção do *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus* metilicina resistentes e *Stenotrophomona maltophilia* (ZHANEL et al., 2007; MOHR, 2008).

Os antibióticos carbapênêmicos têm sido considerados terapia de escolha pela sua estabilidade, espectro de ação e poucos relatos de resistência, além de serem drogas bem toleradas pelos pacientes, sendo os efeitos adversos mais comuns, complicações no sítio da infusão e toxicidade gastrointestinal (NICOLAU, 2008). Na última década, porém, os índices de resistência têm aumentado de forma proporcional ao seu uso como uma resposta adaptativa das bactérias e, muitas vezes como consequência do seu uso indiscriminado (NETO et al., 2007).

1.3.2 Fosfomicina

Os primeiros trabalhos científicos sobre o antibiótico fosfomicina apareceram na 9.ª Conferência Interciência de Agentes Antimicrobianos e Quimioterápicos, em Washington, no ano de 1969. A fosfomicina obtida inicialmente em caldo de fermentação de *Streptomyces fradiae* e depois *Streptomyces viridicromogenes* e *wedmorensis*, sendo facilmente sintetizado posteriormente (LAGUNERO, 1974; STAPLEY, et al, 1970). É um antibiótico de amplo espectro, altamente sensível, de boa tolerância e que atua sobre a bactéria inibindo a etapa inicial da biossíntese da parede celular impedindo a formação do ácido N-acetil murâmico (LORENZO-VELASQUES, 1973).

A fosfomicina é derivada do ácido fosfônico, tendo como mecanismo de ação a inibição de piruvil transferase que é uma enzima citoplasmática que catalisa o primeiro passo da biossíntese dos peptidoglicans (MINASSIAN et al., 1995). No início dos anos 80, foi sintetizado um sal de fosfomicina, a fosfomicina trometamol, que melhorou as suas características farmacológicas favorecendo a administração oral pela sua melhor biodisponibilidade (HENDLIND et al, 1969; PATEL, 1997). A biodisponibilidade oral de uma dose única de fosfomicina trometamol varia de 34% a 41%, mas esta proporção aumenta para 54%-65% quando expressada como uma razão da dose total oral recuperada na urina (BERGAN et al, 1993).

A fosfomicina trometamol possui um amplo espectro antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas comumente associadas à infecção do trato urinário, tendo rápida ação bactericida em baixas concentrações. Estudos têm demonstrado consistentemente a excelente ação bactericida da fosfomicina trometamol diante de várias espécies bacterianas uropatogênicas, em concentrações inibitórias mínimas muito baixas e com baixa ocorrência de resistência bacteriana (GELFAND et al., 1997). Além disso, diversos estudos

comprovam a atividade superior da fosfomicina trometamol frente a outros antimicrobianos, como cotrimoxazol e norfloxacino, na capacidade de aderência dos diversos uropatógenos (SILVA, et al., 2008; BARRY et al , 1991; CARLONE et al, 1987).

O uso de fosfomicina endovenosa tem sido proposto no tratamento de pacientes com infecções sistêmicas por bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos convencionais.

1.4 Combinações de Antimicrobianos

A interação medicamentosa (IM) ocorre quando um medicamento interfere na ação do outro. A ocorrência de IM depende de vários fatores, mas, sobretudo das características dos medicamentos que apresentam potencial interativo, os quais são denominados precipitadores e objetos, dependendo das suas propriedades Farmacocinéticas (BACHMANN, 2001). São chamados precipitadores aqueles agentes que possuem alta ligação às proteínas plasmáticas (PP), que deslocam os medicamentos objeto dos sítios de ligação às PP. O deslocamento de um agente do seu sítio de ligação às PP por outro, eleva seu nível sérico; modificam (induzem ou inibem) o metabolismo de outros. A indução do metabolismo de um agente objeto por um precipitador pode diminuir o nível sérico do primeiro, enquanto a inibição do metabolismo de um agente objeto por um precipitador pode aumentar o nível sérico do primeiro; alteram a função renal e a depuração de medicamentos objeto. Os medicamentos chamados objeto são aqueles que apresentam uma curva dose-resposta com inclinação abrupta, ou seja, cuja alteração da dose, por menor que seja, causa modificação expressiva no efeito farmacológico (GRAHAME-SMITH,2004).

A combinação de antibióticos é realizada com base na susceptibilidade microbiana, pois a potencialização do efeito antimicrobiano é usualmente obtida quando o microrganismo é susceptível a cada um dos antibióticos associados. Entretanto, diferentes estudos têm demonstrado o aumento deste efeito, quando combinações de antibióticos são adicionadas, tanto em cultura de amostras bacterianas sensíveis quanto em amostras resistentes aos agentes testados.

A atuação simultânea de dois antimicrobianos sobre uma bactéria pode resultar em efeito sinérgico, indiferente ou antagônico. A busca de combinações

sinérgicas, na qual uma droga potencializa a outra, é uma justificativa para este trabalho que avalia a interação de imipenem e fosfomicina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar fenotipicamente a resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* de amostras clínicas do HCRP-USP de Ribeirão Preto e avaliar eventual sinergismo entre os antibióticos Fosfomicina e Imipenem sobre *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases e também em *Klebsiella pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras clínicas do Laboratório de Microbiologia HCRP-USP quanto à resistência aos antibióticos carbapenêmicos.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos imipenem e fosfomicina utilizados isoladamente e em combinação.
- Avaliar possível sinergismo entre imipenem e fosfomicina.

3. Material e Métodos

Foram estudados 50 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, sendo que 36 isolados foram fenotipicamente identificados como KPC e 14 foram consideradas sensíveis aos antibióticos testados. Esses isolados foram obtidos das culturas de urina (n=18) e hemocultura (n=32) do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto- HCRP- USP dentre os meses de fevereiro a agosto do ano de 2011.

As amostras foram preservadas em TSB + 20% Glicerol a -20°C e para a realização dos testes fenotípicos e de sinergismo de drogas foram descongeladas e semeadas em ágar sangue com subsequente repique e incubados em estufa microbiológica controlada a 35°C, durante 24 horas.

3.1 Confirmação Fenotípica de Resistência

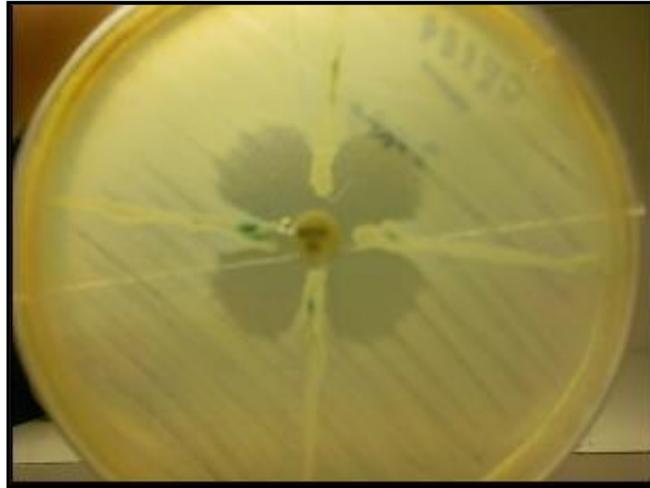
3.1.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados antibiogramas utilizando o sistema automatizado Vitek 2® para obter o perfil de resistência das bactérias previamente identificadas pelo mesmo método. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* que apresentaram um perfil de elevada resistência aos antibióticos foram analisadas novamente quanto a sensibilidade aos antimicrobianos utilizando o método de difusão (Kirby-Bauer). Este teste consiste na aplicação de um inóculo bacteriano, em turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland, à superfície de uma placa de Ágar Mueller-Hinton. Discos de papel de filtro contendo uma concentração definida de antibióticos são distribuídos na superfície da placa que são incubadas por 24 horas. Os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos são medidos em milímetros e interpretados segundo o CLSI 2011. Nas amostras em que os resultados foram discrepantes o método de difusão foi utilizado como padrão ouro.

3.1.3 Teste de Hodge Modificado

Nas amostras para as quais os testes de triagem para a produção de KPC foi positivo realizamos o teste de Hodge Modificado. Um inóculo da cepa de *E. coli* ATCC 25922 é preparado na escala correspondente a 0,5 de Mc Farland e posteriormente semeado em uma placa de agar Mueller-Hinton de maneira homogenia por toda a superfície da placa. Um disco de meropenem foi colocado no centro da placa e ao redor desse disco são feitas estrias com as amostras suspeitas. O teste de Hodge é considerado positivo quando houver um alargamento da área de crescimento bacteriano na inserção com o limite externo do halo de inibição (**Figura 1**).

Figura 1. Teste de Hogde positivo



3.1.4 Avaliação da interação Imipenem X Fosfomicina pelo método checkerboard

A avaliação da interação entre as drogas Imipenem e Fosfomicina foi realizada in vitro pela técnica de “checkerboard” em meio de cultura Mueller Hinton (MH- Oxoid). Foram utilizadas 100 placas de microtitulação de 96 orifícios para a realização do teste em duplicata.

Para a realização do teste foram estabelecidas faixas de concentrações diferentes do imipenem (ABL-Lab Antibióticos do Brasil) para as *Klebsiella pneumoniae* consideradas resistentes aos antimicrobianos (512µg/ml a 1µg/ml) e para as que eram sensíveis ao imipenem (64µg/ml a 0,12µg/ml). Foi utilizada uma cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae* como screening do ponto de corte para Concentração Inibitória Mínima (CIM). A faixa de concentração de fosfomicina (SIGMA) foi a mesma tanto as cepas sensíveis quanto para as resistentes (256µg/ml a 4µg/ml).

As drogas foram diluídas em água destilada estéril, armazenadas a -20°C e descongeladas no momento da realização do experimento. Utilizamos 25µl de cada droga nos orifícios destinados ao teste, 100µl de MH, 5µl de bactéria e água destilada estéril em quantidade para totalizar 155µl em cada poço. As placas foram esquematizadas de maneira em que alguns poços fossem destinados ao controle negativo das drogas, Blank e controles positivos foram incluídos como observado na **Figura 2.**

Figura 2. Protocolo para o teste de sinergismo para *K. pneumoniae* resistente

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	
A	BL	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	512	100µl de MH+25 µl de imp+ 30µl de H ₂ O
		100µl de MH+ 25µ de Imipenem+ 25µl H ₂ O+ 5µl de bactéria										C-	
B	256	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	512	100µl de MH+25 µl de imp+ 25µl de fosfo+ 5µl de H ₂ O
	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	
C	128	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	2	100µl de MH+25 µl de imp+ 25µl de fosfo+ 5µl de H ₂ O
D	64	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	32	
E	32	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	512	100µl de MH+25µl de fosfo+ 30µl de H ₂ O
	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	8	
F	16	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	256	100µl de MH+50µl de H ₂ O +5µl de bactéria
	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	256	
G	8	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	8	C+
H	4	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	4	C+

*Blank= 100µl de MH+ 55 H₂O

A leitura foi feita, após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica, no Fotômetro Multiskan MS e também macroscopicamente através da turvação dos poços onde houve crescimento bacteriano.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das drogas isoladas ou combinadas utilizou-se o critério da menor concentração dos antimicrobianos que reduzisse o crescimento bacteriano a 20% ou menos da média dos controles positivos (cálculo em unidades de absorvância).

4. Resultados e Discussão

4.1 Teste de Hodge Modificado

O teste de Hodge foi realizado para os isolados de *K.pneumoniae* que apresentaram elevado perfil de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos. O total de amostras testadas quanto a produção da enzima carbapenemase foi de 36 e

apenas 16,6% (6) das amostras (nº10, 28, 35, 36,39 e 46) foram consideradas negativas para o teste, indicando que a resistência aos carbapenems verificada nesses isolados possivelmente possa ser atribuída à presença de outros mecanismos como, por exemplo, a AmpC e/ou ESBL associados a alteração dos canais de porina, que modificam a ação e a penetração dos fármacos.

Em pesquisa realizada por Bratu *et al.* (2005) em dois hospitais de Nova York, foram testadas 602 amostras de *Enterobacteriaceae* e 45% apresentaram algum mecanismo de resistência, sendo apenas 3,3% (44) foram confirmadas por biologia molecular como KPC-2. Dessa forma, pode ocorrer resistência aos antimicrobianos de maior espectro e sensibilidade aos de menor espectro de ação, ou seja, resistentes a carbapenems e sensíveis a cefalosporinas de terceira e/ou quarta geração (ROSSI, et al., 2005). Por fim, a diminuição de sensibilidade também pode ocorrer por associação de outras carbapenemases, como a metalobetalactamase (MBL), que hidrolisam todos os betalactâmicos, com exceção do aztreonam (*in vitro*) (QUEENAN, et al., 2007).

4.2 Avaliação da interação Imipenem X Fosfomicina pelo método checkerboard

As CIMs de cada antibiótico e das combinações foram determinadas e utilizadas para o cálculo do índice da fração inibitória (IFI), por meio da seguinte fórmula: $IFI_{imp} = (CIM_{IMP} + FOSF / CIM_{IMP})$ ou $IFI_{fosf} = (CIM_{FOSF} + IMP / CIM_{FOSF})$, em que: CIM IMP+FOSF representa a CIM do imipenem quando associada à fosfomicina e CIM FOSF+IMP representa a CIM da fosfomicina quando associada ao imipenem. A CIM IMP e a CIM FOSF representam a CIM do imipenem e fosfomicina respectivamente, quando testadas isoladamente. A somatória dos IFIs ($SIFI = IFI_{imp} + IFI_{fosf}$) foi utilizada para a classificação dos efeitos, de acordo com os critérios propostos por SONG et al., 2003 : sinergismo ($SIFI \leq 0,5$), sinergismo parcial ($SIFI > 0,5 < 1$), aditivo ($SIFI = 1$), indiferente ($SIFI > 1 < 4$) e antagonismo ($SIFI \geq 4$). Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da Interação entre Imipenem e Fosfomicina.

Isolado	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		IFI Imp	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		IFI Fosf	SIFI
	Imp	Imp+Fosf		Fosf	Fosf+imp		
ATCC	≤ 1	0,25	0,25	>256	8	0,03	0,28
1R	128	8	0,06	>256	32	0,12	0,18
2R	16	≤ 1	0,06	>256	16	0,06	0,12

3S	≤0,12	*	*	>256	*	*	*
4S	0,25	0,06	0,48	128	4	0,12	0,18
5R	64	≤1	0,01	≥256	32	0,12	0,13
6R	8	4	0,5	128	64	0,5	1
7R	16	2	0,12	128	8	0,06	0,18
8S	0,25	≤0,03	0,12	256	≤4	0,01	0,13
9R	512	4	0,00	128	16	0,06	0,06
10R	4	≤1	0,25	256	16	0,06	0,31
11R	128	8	0,06	256	32	0,12	0,18
12S	*	*	*	*	*	*	*
13S	1	0,12	0,12	256	16	0,06	0,18
14S	0,25	0,06	0,24	32	≤4	0,12	0,36
15R	128	4	0,03	>256	64	0,25	0,28
16R	32	16	0,5	64	8	0,12	0,62
17R	64	≤1	0,01	256	≤4	0,01	0,02
18S	0,5	≤0,12	0,06	128	4	0,03	0,09
19S	1	≤0,03	0,03	>256	16	0,06	0,09
20S	0,5	≤0,03	0,06	>256	4	0,01	0,07
21R	16	≤1	0,06	>256	8	0,03	0,09
22S	0,5	≤0,03	0,06	>256	≤4	0,01	0,09
23S	0,5	0,12	0,24	256	16	0,06	0,09
24S	2	0,25	0,12	256	8	0,03	0,15
25R	32	≤1	0,03	128	8	0,06	0,09
26S	1,0	≤0,03	0,03	>256	16	0,06	0,09
27S	4	0,13	0,03	>256	16	0,06	0,09
28R	≤1	*	*	32	*	*	*
29R	16	≤1	0,06	>256	≤4	0,01	0,07
30R	32	≤1	0,03	256	64	0,25	0,28
31R	64	≤1	0,01	>256	16	0,06	0,07
32R	64	≤1	0,01	>256	32	0,12	0,13
33R	32	≤1	0,03	>256	32	0,12	0,15
34R	128	≤1	0,00	>256	≤4	0,01	0,01
35R	32	≤1	0,03	>256	≤4	0,01	0,04
36R	≤1	*	*	64	*	*	*
37R	128	2	0,01	>256	≤4	0,01	0,02
38R	64	2	0,03	>256	64	0,25	0,28
39R	≤1	*	*	256	*	*	*
40R	128	8	0,06	>256	≤4	0,01	0,07

41R	16	≤1	0,06	256	64	0,25	0,31
42R	32	2	0,06	>256	64	0,25	0,31
43R	128	2	0,01	256	32	0,12	0,13
44S	2	0,5	0,25	128	8	0,06	0,31
45R	32	≤1	0,03	>256	64	0,25	0,28
46R	≤1	*	*	>256	*	*	*
47R	64	≤1	0,01	>256	16	0,06	0,07
48R	32	≤1	0,03	>256	16	0,06	0,09
49R	32	≤1	0,03	>256	≤4	0,01	0,04
50R	256	≤1	0,00	128	≤4	0,01	0,01

* Não foi possível avaliar a interação entre as drogas. R- Bactéria Resistente / S- Bactéria Sensível

A análise dos resultados obtidos nos testes de checkerboard, considerando a interpretação do IFI nos permitiu concluir que houve sinergismo entre as drogas testadas para a maioria dos isolados. Observamos que apenas 2 amostras obtiveram SIFI $> 0,5 \leq 1$ assim sendo, a interação entre as drogas foi considerada de sinergismo parcial de acordo com SONG et al., 2003.

Endimiani e colaboradores testaram no ano de 2010 a atividade in vitro da fosfomicina sobre 68 isolados de *K.pneumoniae* que possuíam o gene bla(KPC), utilizando o método de diluição em ágar, e 93% dos isolados foram considerados sensíveis à fosfomicina com MIC50= 16µg/ml e MIC90= 64µg/ml. A sensibilidade de *K.pneumoniae* produtora de carbapenemase à fosfomicina também foi testada por Falagas et al., 2010 e os resultados foram concordantes, pois 94% dos isolados foram considerados sensíveis a este antimicrobiano.

Estudo realizado no ano de 2011 por Souli, Boukovalas, Gourgoulis, Chryssouli, Kanellakopoulou e Panagea demonstraram atividade sinérgica da fosfomicina com o imipenem (64,7%) sobre isolados de *K.pneumoniae* produtora de carbapenemase. De maneira semelhante, Samonis e colaboradores avaliaram em 2011 a combinação de fosfomicina com carbapenêmicos sobre patógenos gram-negativos multi-drogas-resistentes (MDR), os resultados demonstraram 74% de atividade sinérgica entre a fosfomicina e imipenem sobre *K. pneumoniae* MDR.

Fosfomicina não mostrou atividade in vitro contra *K.pneumoniae*, mas a adição de imipenem reduziu a CIM de muitos isolados para níveis inferiores ao

breakpoint. Da mesma forma, imipenem testado conjuntamente com fosfomicina contra isolados produtores de carbapenemase teve importante redução dos valores de CIM. Para vários isolados, a nova CIM de imipenem e fosfomicina atuando simultaneamente, sugere que se possa ter sinergismo e eficácia com as concentrações que essas drogas atingem no sangue e na urina dos pacientes em tratamento. Para outros isolados, a concentração de cada droga necessária para obter sinergismo foi muito elevada, prenunciando ineficácia da combinação dos antibióticos na terapêutica humana. É interessante, portanto, testar cada isolado de *K.pneumoniae* produtor de carbapenemase pelo método checkerboard para avaliar a utilidade clínica da combinação imipenem com fosfomicina.

Em uma época em que constatamos um grande aumento na resistência bacteriana e o desenvolvimento de novos antibacterianos ativos contra bacilos gram-negativos é escasso, a combinação de drogas de diferentes grupos pode ser uma estratégia de tratamento útil quando a monoterapia não encontra resultados satisfatórios. Testes de sinergismo podem auxiliar a determinar a mais apropriada associação para infecções causadas por microrganismos resistentes

5. Conclusões

- 86,2% das bactérias fenotipicamente consideradas resistentes aos carbapênemicos foram positivas para o teste Hodge modificado indicando produção de carbapenemase.
- O teste de checkerboard demonstrou a ocorrência de atividade sinérgica entre as drogas imipenem e fosfomicina tanto para *K.pneumoniae* com perfil de sensibilidade aos antimicrobianos quanto para as resistentes a carbapenêmicos.

6. Referências

ALBA, J., Y. ISHII, K. THOMSON, E. S. MOLAND, AND K. YAMAGUCHI. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4760–4762, 2005.

ANDERSON, K. F. et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 8, p. 2723-5, 2007.

ARDUANY, C., LINARES, J., DOMINGUES, M. A., HERNANDES-ALLEZ, S., BENEDÍ, V. J., MARTINEZ-MARTINEZ, L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenemicos. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul: 42 (7): 1636-40, 1998.

BACHMANN, K. A. Drug interactions handbook. Hudson: Lexi-Comp; 2003.

Secoli, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. *Rev Esc Enferm USP*; 35 (1):20-6, 2001.

BARRY et al. In vitro susceptibility testing procedures for fosfomicin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemoter*; 35:1235-1238, 1991.

BRADFORD, P. A., S. BRATU, C., URBAN, M., VISALLI, N., MARIANO, D., LANDMAN, J. J., RAHAL, S., BROOKS, S., CEBULAR, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenemhydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **39**:55–60, 2004.

BRATU, S. et al. Rapid Spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med*, v. 165, p. 1430-5, 2005.

BERGAN, T., et al. Pharmacokinetic profile of fosfomicin trometamol. *Chemotherapy*; 39 (Sept-Oct): 297-301, 1993.

CLSI. **Clinical and laboratory standards institute**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Table: M100 - S19; 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, PA 19087-1898 USA, 2009.

CARLONE, N. A., et al. Effect of fosfomicin trometamol on bacterial adhesion in comparison with other chemotherapeutic agents. **Eur Urol**; 13: 86-91, 1987.

DESHPANDE, L. M., P. R. RHOMBERG, H. S., SADER, AND R. N. JONES. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States medical centers: report from the MYSTIC program (1999–2005). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 56:367–372, 2006.

ENDIMIANI, A., PATEL, G., HUJER, K. M., SWAMINATHAN, M., PEREZ, F., RICE, L. B., JACOBS, M. R., BONOMO, R. A. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrob Agents Chemother.** Epub. Jan; 54(1) 526-9, 2010

FELDER, K. A., BIEDENBACH, D. J., JONES, R. N. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. **Diagn Microbiol infect Dis.** Dec; 56 (4): 427-36, 2006.

GELFAND, M., JOHNSON, R. Single dose fosfomicin trometamol: evaluation in the treatment of uncomplicated lower urinary tract infection. **Adv Ther**; 14(2): 479,1997.

GRAHAME-SMITH, D. G., ARONSON, J. K. Interações medicamentosas. In: Grahame-Smith, D. G., Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia. 3ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; p. 98-109,2004

HENDLIND, I., et al. Phosphomycin: a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. **Science**; 166: 122-123, 1969.

KIFFER, C., HSIUNG, A., OPLUSTIL, C., SAMPAIO, J., SAKAGAMI, E., TURNER, P., MENDES, C. Antimicrobial Susceptibility of Gram Negative Bacteria In Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazil Journal Infection Disease**. Jun; 9 (3): 216-24, 2005.

KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAGUNERO, L. R., MENENDEZ, L. M. Infecciones urinarias tratadas con fosfomicina. **Folia clin, int.**, Barcelona, **2**:1-15, 1974.

LANDMAN, D. *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p. 78-82, 2007.

LOMAESTRO, B. M., TOBIN, E. H., SHANG, W., GOOTZ, T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. **Clin. Infect. Dis.** 43:e26–e28, 2006.

LORENZO-VELASQUES, B. — Un nuevo antibiotico, sencillo, de amplio espectro y de buena tolerancia. La fosfomicina. **Arch. Fac. Med., Madrid**, **23**:307-10, 1973.

MEYER, K. S., *et al.* Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late generation cephalosporins. **Ann Intern Med**, v. 119, p. 353-8, 1993.

MINASSIAN, M. A., *et al.* The clinical pharmacology of fosfomicin trometamol **Rev Contemp Pharmacother**; 6 (2): 45-53, 1995.

MOHR, J. F. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clinical Inf. Dis.** Sep 15;47. Suppl 1:S 41-51, 2008

NAAS, T., NORDMANN, P., VEDEL, G., POYART, C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrob. Agents Chemother.** **49**:4423–4424, 2005.

NAVON-VENEZIA, S., CHMELNITSKY, I., LEAVITT, A., SCHWABER, M. J., SCHWARTZ, D., CARMELI, Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrob. Agents Chemother.** **50**:3098–3101, 2006.

NETO, V. A., NICODEMO, A. C., VASCONCELLOS, H. Antibióticos na prática Médica. 6 ed. **Editorial Sarver**, São Paulo, Brazil, 2007.

NICOLAU, D. P. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic properties of meropenem. **Clin Infect Dis.** Sep 15; 47 Suppl 1:S 32-40, 2008.

OPLUSTIL, C., MENDES, C., SAKAGAMI, E., TURNER, P., KIFFER, C. Antimicrobial Susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. **Braz. J. Infect. Dis.** 9(1): 44-51,2005.

PATEL, S., et al. Fosfomicin trometamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. **Drugs**; 53(4): 637-656,1997.

PEREIRA, A. et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectroestendido. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, p. 301-8, 2003.

QUEENAN, A. M., BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n.3, p. 440-58, 2007.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

SAMONIS, G., MARAKI, S., KARAGEORGOPOULOS, D. E., VOULOUMANOU, E. K., FALAGAS, M. E. Synergy of fosfomicin with carbapenems colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** Jul 31, 2011.

SAMPAIO, J. L. M. Mecanismo De Ação Dos Antibióticos. IN NETTO, A.; NICODEMO, V.; LOPES, A.C.; VASCONCELOS, H. **Antibióticos na Prática Médica** 6. Ed. São Paulo, v.1, p. 17-25, 2007.

SILVA, A., MACHADO, P., RODRIGUES, V., DUARTE, A. Bactérias uropatogénicas identificadas de cistites não complicadas de mulheres na comunidade. **Acta Urológica**, 25; 3: 9-14,2008.

SMITH MOLAND, E., HANSON, N. D., HERRERA, V. L., BLACK, J. A., LOCKHART, T. J., HOSSAIN, A., JOHNSON, J. A., GOERING, R. V., THOMSON, K. S. Plasmidmediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** **51**:711–714, 2003.

SONG, W., WOO, H. J., KIM, J.S., LEE, K. M. In vitro activity of β -lactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**;21:8-12,2003.

STAPLEY, E. O., et al. Phosphonomycin. Discovery and in vitro biological characterization. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1969. p. 284-90, 1970.

WALTHER-RASMUSSEN, J., HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Atimicrob Chemother.** Sep; 60 (3): 470-82, 2007.

SOULI, M., GALANI, I., BOUKOVALAS, S., GOURGOULIS, M. G., CHRYSSOULI, Z., KANELLAKOPOULOU, K., PANAGEA, T. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. **Antimicrob Agents Chemother.**Epub. May: 55 (5): 2395-7, 2011.

WOLTER, D. J., KURPIEL, P. M., WOODFORD, N., PALEPOU, M. F., GOERING,R. V., HANSON, N.D. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis between the novel KPC variant, KPC-5, and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrob Agents Chemother.** Nov 17, 2008.

YIGIT, H., QUEENAN, A. M., RASHEED, J. K., BIDDLE, J. W., DOMENECH-SANCHEZ, A., ALBERTI, S., BUSH, K., TENOVER, F. C. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. **Antimicrob Agents Chemother.** 47:3881–3889, 2003.

ZHANEL G.G., WIEBE R., DILAY L., KARLOWSKY J.A. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*; 6 1027-52, 2007.