

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E  
FISIOPATOLOGIA

JAMES ALBIERO

Avaliação farmacodinâmica de antimicrobianos puros ou combinados contra  
bacilos Gram negativos multirresistentes.

Maringá  
2019

JAMES ALBIERO

Avaliação farmacodinâmica de antimicrobianos puros ou combinados contra bacilos Gram negativos multirresistentes.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Fisiopatologia.

Área de Concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas a Farmácia

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cristina Bronharo Tognim

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvana Martins Caparroz Assef

Maringá  
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Albiero, James

A335a Avaliação farmacodinâmica de antimicrobianos puros ou combinados contra bacilos gram negativos multirresistentes/ James Albiero. -- Maringá, 2019.

127 f. : il. , figs. , tabs

Orientadora: Prof.a. Dr.a. Maria Cristina Bronharo Tognim.

Coorientador: Prof.a. Dr.a. Silvana Martins Caparroz Assef.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2019.

1. Microbiologia. 2. Fosfomicina - Antimicrobiano . 3. Gentamicina - Antimicrobiano. 4. Terapia combinada. 5. Pseudomonas aeruginosa - Bactéria. 6. Klebsiella pneumoniae. I. Tognim, Maria Cristina Bronharo, orient. II. Assef, Silvana Martins Caparroz, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. IV. Título.

CDD 22. ED. 616.01

*Jane Lessa Monção CRB9 1173*

# FOLHA DE APROVAÇÃO

JAMES ALBIERO

## AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA DE ANTIMICROBIANOS PUROS OU COMBINADOS CONTRA BACILOS GRAM NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Ciências Básica da Saúde, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Maria Cristina Bronharo Tognim  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente da banca)

Profª Drª Floristher Elaine Carrara Marroni  
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Vera Lúcia Dias Siqueira  
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Fabrícia Gimenes  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Jorge Juarez Teixeira  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em 26 de abril de 2019

Local de defesa: Bloco I-90, sala 110, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## Dedicatórias

Dedico esse trabalho a minha esposa Adriana e aos meus filhos Ana Luiza e André, motivos da minha vida e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, naquele que sempre busquei e encontrei amparo, calma, força, respostas, superação das frustrações, luz, orientação, e muitos outros motivos para continuar esse trabalho;

À minha orientadora CRIS, que além de enxergar em mim potencialidades para a execução desse longo e árduo trabalho, soube extrair valores e deixar desconfortos, propor soluções e alternativas diante dos limites encontrados, e superar dificuldades;

Ao Professor Josmar, que se disponibilizou em compreender a importância do seu conhecimento para o nosso grupo, principalmente em simulação de Monte Carlo, tornando-se com o tempo um grande parceiro de trabalho;

Ao Sherwin que além de ensinar-me sobre questões técnicas dos assuntos trabalhados e como descrevê-los, mostrou-nos que podemos alcançar objetivos maiores;

À minha esposa Adriana e meus filhos André e Ana Luiza, que participaram continuamente, de forma direta ou indireta na execução desse trabalho, apoiando, argumentando motivos, convencendo-me de continuar compreendendo muitas vezes a minha ausência, ajudando-me a entender outras pessoas, e muitas vezes apenas ouvindo, sempre comemorando e valorizando os resultados;

À minha mãe Edna, meu pai Lauro (*in memoriam*) e minhas irmãs Márcia e Ana Rosa, que desde o término do curso de Farmácia e Bioquímica no ano de 1989, acreditavam que eu deveria continuar os meus estudos e nunca deixaram de me estimular e comemorar os resultados;

Aos Professores Silvana, Sheila, Fabrícia, Celso Cardoso, Lurdes, Benício, Bene, Tânia e Celso Nakamura, destes, alguns que participaram diretamente nos trabalhos e, a todos que diariamente trataram-me com muito respeito, cordialidade e disponibilidade;

Às técnicas Adriana, Maria, Vilma e Rosana, que além de assumir com muita responsabilidade a montagem das aulas e cuidar dos laboratórios como suas próprias casas, sempre estavam dispostas a ajudar e apoiar não só os alunos de graduação e como os da pós graduação, além de proporcionar momentos de lazer e integração entre TODOS;

Aos meus colegas de pós-graduação, que não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém, os quais dividiram, muito além do espaço na sala de estudos e laboratório, demonstrando um grande senso de equipe, e sempre comprometidos um com o sucesso do outro.

A Luciana, secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, por sua competência, atenção, disponibilidade e gentileza;

A Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade de vivenciar a ciência em sua plenitude e por ser uma das melhores universidades do Brasil;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pela bolsa de estudos concedida.

## Avaliação farmacodinâmica de antimicrobianos puros ou combinados contra bacilos Gram negativos multirresistentes

### RESUMO

Os bacilos Gram negativos multirresistentes (MDR) como *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase (Pa-MBL) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (Kp-KPC) continuam causando altas taxas de morbimortalidade em todo o mundo, e ainda faltam antimicrobianos efetivos e acessíveis para combatê-los. Vários estudos clínicos mostraram que a terapia combinada com antimicrobianos conhecidos, incluindo meropenem (MEM), fosfomicina (FOF) e gentamicina (GEN), foi mais efetiva que a monoterapia, mas não definiram posologias. Esse estudo avaliou o sinergismo de (MEM + FOF) contra Pa-MBL e (MEM + GEN) contra Kp-KPC e comparou o alcance farmacodinâmico dos regimes em monoterapia ou terapia combinada, propondo posologias adequadas, conforme descrito nos dois artigos: a) “Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase”; b) “Resgate do meropenem combinado com gentamicina contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2”. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram determinadas por microdiluição, e o sinergismo por *checkerboard* das associações de MEM + FOS contra 19 isolados clínicos de *P. aeruginosa* (10 MBL e 9 não MBL), e MEM + GEN contra 18 isolados clínicos Kp-KPC. Análises farmacodinâmicas (AF) foram realizadas por simulação de Monte Carlo dos regimes plenos de MEM (1 g q8h; 1,5 g q6h, 2 g q8h) infundidos (Inf) em 0,5 h ou 3 h e regimes de FOF (4 g q8h; 4 g q6h; 6 g q8h; 8 g q8h) inf 0,5 h, contra as MICs dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos com sais puros e em associação, assim como regimes de MEM (1 g q8h; 1.5 g q6h, 2 g q8h) inf 0.5 ou 3 h contra as MICs dos isolados de Kp-KPC obtidos de MEM puro ou combinado com GEN. Regimes adequados foram considerados aqueles com probabilidade de alcançar o alvo (PTA)  $\geq 90\%$ . A AF do regime de GEN (490 mg q24h) foi realizada por estimativa da concentração em um paciente crítico virtual. Os índices farmacodinâmicos e valores alvos utilizados para os regimes de MEM, FOF e GEN foram  $\%fT > MIC \geq 40\%$ ,  $fAUC_{24h}/MIC \geq 40.8$ ,  $C_{max}/MIC \geq 10$ , respectivamente, e as posologias foram ajustados para a disfunção renal conforme o clearance de creatinina. A combinação de MEM + FOF contra isolados de *P. aeruginosa* reduziu as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> para 1/8 das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> puras. Sete (44%) dos isolados de *P. aeruginosa* classificados como intermediários ou resistentes ao meropenem, tornaram-se sensíveis a esse agente, sendo que quatro desses eram Pa-MBL. A AF das posologias plenas, regimes de MEM em monoterapia atingiram PTA  $\geq 90\%$

(MIC = 4 mg/L) para 6 (32%) isolados, e quando combinados MEM + FOF atingiram PTA  $\geq 90\%$  na mesma MIC para 13 (68%) isolados. Nenhum regime de FOF em monoterapia alcançou PTA  $\geq 90\%$  (MIC = 16 mg/L), entretanto, quando combinados com MEM, todos os regimes alcançaram PTA adequada na mesma MIC para 14 (74%) isolados. Em relação aos isolados de Kp-KPC, as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> do MEM após a combinação MEM + GEN foram reduzidas em 1/32 e 1/8, respectivamente, das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> puras, e para a GEN a combinação com MEM reduziu as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> para 1/4 das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> puras. Dos isolados resistentes ao MEM, oito (44%) tornaram-se sensíveis quando combinados com GEN. O sinergismo ocorreu em 94% dos testes, e nenhum antagonismo foi verificado. A AF mostrou que os regimes de MEM + GEN otimizados, ampliaram a cobertura da PTA  $\geq 90\%$  (MIC = 4 mg/L) de 3 (17%) isolados para 16 (89%) isolados e na (MIC = 16 mg/L). Os dois estudos realizados demonstraram de modo evidente a ação sinérgica das combinações antimicrobianas de MEM + FOF contra isolados de Pa-MBL, assim como na associação de MEM + GEN contra isolados de Kp-KPC avaliadas, constatada pela redução nas MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, bem como a mudança de categoria resistente para sensível, e a ampliação das coberturas farmacodinâmicas verificadas após as respectivas combinações, demonstrando assim o potencial das combinações em posologias máximas diárias e otimizadas de MEM + FOF para tratar infecções por Pa-MBL, como também, MEM + GEN para tratar infecções por Kp-KPC.

**Palavras-chave:** Meropenem. Fosfomicina. Gentamicina. Terapia combinada. *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella pneumoniae*.

## Pharmacodynamic evaluation of alone or combination antimicrobials against multidrug-resistant Gram-negative bacillus

### **ABSTRACT**

Multidrug-resistant (MDR) Gram negative bacillus, such as Metallo-beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* (MBL-Pa) and Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-Kp), continue to cause high morbidity and mortality rates worldwide, and effective and accessible antimicrobials are still lacking to combat them. Several clinical studies have shown that combination therapy with known antimicrobials, including meropenem (MEM), fosfomicin (FOF) and gentamicin (GEN), was more effective than monotherapy, but did not define dosages. This study evaluated the synergism of (MEM + FOF) against MBL-Pa and (MEM + GEN) against KPC-Kp and compared the pharmacodynamic reach of the monotherapy and combination therapy regimens and proposed suitable dosages, as described in the two articles: a) "Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomicin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase"; b) "Rescue of meropenem in combination with gentamicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*". Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution, and the synergism of associations by checkerboard of MEM + FOF against 19 clinical isolates of *P. aeruginosa* (MBL, 10; not MBL, 9), and MEM + GEN against 18 clinical isolates of Kp-KPC. Pharmacodynamic analyzes (PA) were performed by Monte Carlo simulation of the full regimens of MEM (1 g q8h, 1.5 g q6h, 2 g q8h) infused (Inf) in 0.5 h or 3 h and regimens of FOF (4 g q8h, 4 g q6h, 6 g q8h, 8 g q8h) inf 0.5 h, against the MICs of *P. aeruginosa* isolates obtained with pure salts and in association, as well as regimens of MEM (1 g q8h; 1.5 g q6h, 2 g q8h) inf 0.5 or 3 h against the MICs of Kp-KPC isolates obtained from MEM pure or combined with GEN. Appropriate regimens were considered those with probability of target attainment (PTA)  $\geq 90\%$ . The PA of the GEN regimen (490 mg q24h) was performed by estimating the concentration in a virtual critical patient. The pharmacodynamic indexes and target values used for MEM, FOF, and GEN regimens were  $\%fT > MIC \geq 40\%$ ,  $fAUC_{24h}/MIC \geq 40.8$ ,  $C_{max}/MIC \geq 10$ , respectively, and the dosages were adjusted for renal dysfunction according to creatinine clearance. MEM + FOF combination against *P. aeruginosa* isolates reduced the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> to 1/8 of the respective pure MICs. Seven (44%) isolates of *P. aeruginosa* classified as intermediate or resistant to meropenem have become sensitive to this agente, and four of which were Pa-MBL. The PA of full doses, MEM regimens in monotherapy reached PTA  $\geq 90\%$  (MIC = 4 mg/L) for

6 (32%) isolates, and when combined MEM + FOF reached PTA  $\geq 90\%$  in the same MIC for 13 (68 %) isolated. No monotherapy FOF regimen achieved PTA  $\geq 90\%$  (MIC = 16 mg/L), however, when combined with MEM, all regimens achieved adequate PTA in the same MIC for 14 (74%) isolates. Regarding Kp-KPC isolates, the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of the MEM after the MEM + GEN combination were reduced to 1/32 and 1/8, respectively, of the pure MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>; and for GEN, the combination with MEM reduced the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> to 1/4 of the pure MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>. Of the isolates resistant to MEM, eight (44%) became sensitive when combined with GEN. Synergism occurred in 94% of the tests, and no antagonism was found. The PA showed that the combined regimes of MEM + GEN and optimized, increased coverage PTA  $\geq 90\%$  (MIC = 4 mg/L) of 3 (17%) isolates for 16 (89%) isolates, and in (MIC = 16 mg/L). The two studies performed in this thesis clearly demonstrated the synergistic action of antimicrobial combinations of MEM + FOF against Pa-MBL isolates, as well as the association of MEM + GEN against Kp-KPC isolates evaluated, observed by the reduction in the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, as well as the change from resistant to sensitive category, and the expansion of pharmacodynamic coverage verified after the respective combinations, thus demonstrating the potential of combinations in maximal dosages daily and optimized of MEM + FOF to treat Pa-MBL infections, as well as MEM + GEN to treat Kp-KPC infections.

**Keywords:** Meropenem. Fosfomicin. Gentamicin. Drug-combination therapy. *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella pneumoniae*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I

Tabela 1. Antimicrobianos, índices de PK/PD e respectivos valores alvos da posologia no paciente.

Tabela 2. Atividade dos novos antimicrobianos contra as  $\beta$ -lactamases.

Figura 1. Interação entre os parâmetros do paciente, patógenos e antimicrobiano que interferem no resultado clínico do regime terapêutico

Figura 2. Gráfico de concentração x tempo demonstrando os três índices de PK/PD:  $C_{max}/MIC$ ;  $AUC/MIC$ ;  $\%fT>MIC$

Figura 3. Métodos usados pelo EUCAST para estimar os breakpoints de susceptibilidade por meio de PK/PD usando um carbapenem como exemplo (alvo:  $\%fT>MIC, \geq 40\%$ ). a: método por meio de  $PTA \geq 90\%$  e o valor estimado do breakpoint susceptível ( $MIC \leq 2mg/L$ ); b: método por meio do índice de PK/PD com intervalo de confiança de 95% e o valor estimado do breakpoint susceptível ( $MIC \leq 1 mg/L$ )

Figura 4. Gráficos de sinergismo por resposta de superfície. a: isoblograma de sinergismo demonstrado pelas linhas e respectivos valores de  $\alpha$  (A, 100; B, 2; C, 1; D, 0.5; E, 0; F, -0.5; G, -0.75; H, -0.99); b: gráfico na forma de plano representando 9 isolados com resultado de sinergismo ( $\alpha > 0$ ) para a combinação de tobramicina + meropenem

### Capítulo II

**Artigo:** Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of meropenem and fosfomycin alone or in combination against non-MBL and MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates by fractional inhibitory concentration index (FICI) and Loewe additivity index analysis

Table 2. Probabilities of target attainment at pharmacodynamic surrogate indices for fosfomycin at 40.8  $fAUC/MIC$  ( $CL_{Cr} >40\text{mL/min}$ ) and for meropenem at 40%  $fT > MIC$  ( $CL_{Cr} >50\text{mL/min}$ ) against non-MBL- and MBL-producing *P. aeruginosa* clinical isolates by dosing regimens in monotherapy and combination therapy.

Table 3. Cumulative fraction of response (CFR) for fosfomycin at 40.8  $fAUC/MIC$  ( $CL_{Cr} >40\text{mL/min}$ ) and meropenem at 40%  $fT > MIC$  ( $CL_{Cr} >50\text{mL/min}$ ) against non-MBL and MBL-producing *P. aeruginosa* clinical isolates by dosing regimens in monotherapy and combination therapy

Table 4. Probability of target attainment (%) surrogate indices for meropenem at 40%  $fT > MIC$  relative to the minimum inhibitory concentration, duration of intravenous infusion (0.5 h and 3 h) and creatinine clearance.

Figure 1. MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental fosfomycin MICs in monotherapy and in combination with meropenem and probability of target attainment of  $fAUC/MIC \geq 40.8$  for the fosfomycin dosing regimens of 4 g q8h, 4 g q6h, 6 g q6h, 8 g q8h ( $CL_{Cr} >40 \text{ mL/min}$ ), 2.8 g q6h, 2.8 g q8h, 4.2 g q8h, 5.6 g q8h ( $CL_{Cr} 20 - 40 \text{ mL/min}$ ), 2 g q6h, 2 g q8h, 3 g q8h, 4 g q6h ( $CL_{Cr} 10 - <20 \text{ mL/min}$ ) and 1.2 g q6h, 1.2 g q8h, 1.8 g q8h, 2.4 g q6h ( $CL_{Cr} <10 \text{ mL/min}$ ) in critically ill virtual patients.

Figure 2. MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental fosfomycin MICs in monotherapy and in combination with meropenem and probability of target attainment of  $fAUC/MIC \geq 193$  (worst-case scenario) for the fosfomycin dosing regimens of 4 g q8h, 4 g q6h, 6 g q6h, 8 g q8h ( $CL_{Cr} >40 \text{ mL/min}$ ), 2.8 g q6h, 2.8 g q8h, 4.2 g q8h, 5.6 g q8h ( $CL_{Cr} 20 - 40 \text{ mL/min}$ ), 2 g q6h, 2 g q8h, 3 g q8h, 4 g q6h ( $CL_{Cr} 10 - <20 \text{ mL/min}$ ) and 1.2 g q6h, 1.2 g q8h, 1.8 g q8h, 2.4 g q6h ( $CL_{Cr} <10 \text{ mL/min}$ ) in critically ill virtual patients.

Figure 3. MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental meropenem MICs in monotherapy and in combination with fosfomycin and probability of target attainment of 40%  $fT > MIC$  for the meropenem dosing regimens of 1 g q8h, 2 g q8h, and 1.5 g q6h ( $CL_{Cr} >50 \text{ mL/min}$ ), 1 g q12h, 1

g q6h, 2 g q12h (CLcr >25 - 50 mL/min), 0.5 g q12h, 0.5 g q6h, 1 g q12h (CLcr 10 - 25 mL/min), 0.5 g q24h, 0.5 g q12h, 1 g q24h (CLcr <10 mL/min) in critically ill virtual patients.

**Manuscrito:** O resgate do meropenem combinado com gentamicina contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC) do meropenem e gentamicina sozinhos ou em combinação e avaliação do sinergismo por índice de fração da concentração inibitória (FICI) e índice de aditividade de Loewe contra 18 isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2

Tabela 2. Probabilidade de atingir o alvo no índice farmacodinâmico mínimo (40%  $fT > MIC$ ) pelos regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada nas faixas de CLcr contra as MIC50 e MIC90 dos 19 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2.

Tabela 3. Fração cumulativa de resposta (CFR) no índice farmacocinâmico mínimo (40%  $fT > MIC$ ) dos regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada nas faixa de CLcr contra os 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2.

Tabela 4. Concentrações máximas alcançadas pelos diferentes regimes de gentamicina nos respectivos clearances de creatinina de acordo com o normograma de Hartford, em paciente grave hipotético (homem, branco, pesando 70 Kg, sem diferença significativa entre peso ideal e total), estimadas por modelo farmacocinético padrão de 1 compartimento.

Tabela 5. Razão da Cmax dos regimes de gentamicina (490 mg q24h; 490 mg q36h; 490 mg q48h) nos respectivos CLcr (100 mL/min; 50 mL/min; 30 mL/min) pela MIC (Cmax/MIC) dos isolados testados contra gentamicina sozinha ou em combinação com meropenem.

Figura 1. Frequência das MICs dos 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 nas nos valores de crescents de MICs do meropenem em monoterapia e terapia

combinada e probabilidade de alcançar o alvo ( $40\%fT > MIC$ ) dos regimes de dose do meropenem nos CLcr: CLcr  $>50$  mL/min (1 g q8h; 1.5 g q6h; 2 g q8h); CLcr  $>25 - 50$  mL/min (1 g q12h, 1 g q6h, 2 g q12h); CLcr  $10 - 25$  mL/min (0.5 g q12h, 0.5 g q6h, 1 g q12h); CLcr  $<10$  mL/min (0.5 g q24h, 0.5 g q12h, 1 g q24h) em pacientes críticos virtuais.

Os gráficos a esquerda mostram os regimes de meropenem infundidos em 0.5 horas, e os gráficos a direita mostram os regimes de meropenem infundidos em 3 horas.

Tese elaborada e formatada conforme as normas das publicações científica:

Vancouver (capítulo I) disponível em:  
[https://web.archive.org/web/20111114053104/http://www.fisterra.com/recursos\\_web/mbe/vancouver.asp](https://web.archive.org/web/20111114053104/http://www.fisterra.com/recursos_web/mbe/vancouver.asp)

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (artigo 1) disponível em:

<https://www.aac.asm.org/content/submit-manuscript>

e International Journal of Antimicrobial Agents (artigo 2) disponível em:

<http://www.ijaaonline.com/content/authorinfo>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b>	18
Introdução	18
Justificativa	46
Objetivos	47
Geral	47
Específicos	47
Referências	48
<b>CAPÍTULO II</b>	58
Artigo: “Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomicin combination against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> producing metallo- $\beta$ -lactamase”	60
Manuscrito: “O resgate do meropenem combinado com gentamicina contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC-2”.	96
<b>CAPÍTULO III</b>	126
Conclusões	126
Perspectivas futuras	127

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Os benefícios promovidos com o uso clínico da penicilina na década de 1940 revolucionou o tratamento das doenças infecciosas, como também, demonstrou na época, o enorme potencial dos antibióticos para a assistência à saúde e estimulou a indústria farmacêutica a desenvolver novos agentes. Entretanto, o efeito indesejado da resistência microbiana foi aparecendo subsequente a cada novo antimicrobiano utilizado na clínica e se disseminando, tornando-se com o tempo um dos problemas mais temidos pela saúde pública em todo o mundo, sendo considerado a “crise da medicina moderna” (1). Atualmente, o desenvolvimento de novos antimicrobianos alcançou um “certo platô”, mas a resistência microbiana continua sendo detectada até contra antimicrobianos em desenvolvimento ou recentemente aprovados (2-3).

Para aumentar a conscientização sobre esse problema ameaçador à vida, em 2013 o *Central for Disease Control and Prevention* (CDC) emitiu um documento apontando os 18 patógenos multidrug-resistant (MDR) mais temidos nos Estados Unidos da América (EUA) e suas possíveis consequências caso nenhuma ação for tomada, estimando causarem infecções em mais de 2 milhões de pessoas por ano, das quais 23.000 morreriam (4).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua vez alertou que se a resistência microbiana não for efetivamente contida, causará um problema imponente e eminente com capacidade de alterar os sistemas de saúde em todo o mundo pela falta de terapia antimicrobiana viável. A OMS também recomenda ações abrangentes por meio de vários níveis que envolvam toda a sociedade, profissionais de saúde, pacientes, indústria farmacêutica, serviços de saúde públicos e privados, e órgãos de saúde nacionais e global. Estima-se que atualmente no mundo a resistência microbiana seja responsável por 700.000 mortes ao ano, e se não houver nenhuma ação importante e efetiva para combatê-la, deverá causar 10 milhões de mortes em 2050 (5-7).

O congresso dos EUA, diante da obsolescência dos atuais antimicrobianos causada pela resistência microbiana e do desinteresse da indústria farmacêutica em desenvolver novos agentes, aprovou em 2011 a lei GAIN (*Generating Antibiotic Incentive Now*), fornecendo incentivos econômicos para descobrir, desenvolver e acelerar a aprovação de novos antimicrobianos, além de incluir novos diagnósticos e programas de stewardship (8).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas nos últimos anos vem dando atenção especial a um grupo de bactérias Gram positivas e Gram negativas denominadas pelo acrônimo

ESKAPE, referindo-se aos patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Esse alerta destacado justifica-se pelo elevado potencial dessas bactérias em hospedar importantes mecanismos de resistência que reduzem as opções terapêuticas, como também, serem comuns causadoras de infecções em pacientes críticos imunocomprometidos com risco de vida (9,10).

Seguindo a mesma importância disponibilizada para formar o grupo “ESKAPE”, nossa equipe de pesquisa selecionou os patógenos *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* para avaliar nesse estudo regimes combinados de antimicrobianos (meropenem, fosfomicina e gentamicina), conhecidos e disponíveis na maioria dos serviços de saúde no mundo.

### **1. *Pseudomonas aeruginosa***

Bactéria Gram negativa (BGN) em forma de bastões, aeróbica facultativo não fermentador da glicose, que faz parte da microbiota normal intestinal em pequenas quantidades na população geral, entretanto, são frequentemente encontradas nos pacientes críticos hospitalizados causando infecções, e normalmente originados de uma fonte exógena (10). O grande potencial de hospedar diversos tipos de mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos, produzir biofilmes e fatores de virulência, e elevada capacidade de disseminação, destaca-se a *P. aeruginosa* dos demais patógenos ESKAPE (10,11).

A resistência intrínseca da *P. aeruginosa* é principalmente mediada pela combinação dos mecanismos de redução na permeabilidade das porinas aos antimicrobianos, produção de cefalosporinase AmpC induzível, e os sistemas constitutivos de bomba de efluxo MexAB-OprM e MexXY-OprM (12).

A permeabilidade reduzida das porinas na *P. aeruginosa* dificulta naturalmente a penetração de antimicrobianos e outras substâncias nesse patógeno. Como exemplo, a deficiência da proteína OprD na membrana externa da *P. aeruginosa* dificulta a permeabilidade aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem, favorecendo a resistência a esses  $\beta$ -lactâmicos (13).

Dois mecanismos de resistência enzimáticos constitutivos estão presentes na *P. aeruginosa*. O *bla*<sub>oxa-50</sub> oxacillinase apresenta menor importância na alteração de susceptibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos, diferente da resistência mediada por AmpC que confere resistência a cefuroxima e ceftriaxona. O sistema de efluxo MexAB-OprM confere resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (exceto imipenem), fluorquinolonas, sulfametoxazol/trimetoprima, cloranfenicol e tetraciclina, enquanto o MexXY-OprM confere resistência a cefepima,

aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprima, e macrolídeos (12).

A exemplo de outros patógenos, *P. aeruginosa* apresenta a capacidade intrínseca de se organizar em comunidades celulares formando biofilmes, conferindo assim tolerância a ação de algumas classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina e colistina (14).

Além da resistência natural, *P. aeruginosa* é capaz de adquirir mecanismos adicionais, os quais podem modificar a estrutura e/ou expressar genes pré-existentes por mutações ou receber horizontalmente determinantes de resistência. A presença de antimicrobianos causam estresse celular e podem levar a seleção de mutação pontual estimulando os sistemas intrínsecos de bomba de efluxo (MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN), elevando a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) (15). A mutação em gene regulatório também pode expressar AmpC, como também as mutações em gene regulatório *gyrA/gyrB* e *parC/parD*, causando resistência às fluorquinolonas (12).

Sistemas enzimáticos de resistência comumente encontrados em outras espécies também são detectados atualmente em *P. aeruginosa*, podendo ser exemplificado pelas  $\beta$ -lactamases de espectro expandido (ESBL) como PER, SHV, PME, GES, e até os mediados por CTX-M que são típicas da família Enterobacteriaceae. Embora a resistência da *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos seja normalmente mediada por deficiência de porina combinada com o sistema de bombas de efluxo, os mecanismos enzimáticos *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalo  $\beta$ -lactamase (MBL) e mais recentemente as ESBL (variantes GES), também podem ser encontrados nesse patógeno, sendo capazes de hidrolisar carbapenêmicos (16).

## **2. *Klebsiella pneumoniae***

Bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, normalmente encapsulado, fazendo parte da microbiota intestinal. Esse patógeno e outras espécies do gênero são frequentemente associados às infecções graves nos serviços de saúde, principalmente em pacientes críticos imunocomprometidos internados em unidade de terapia intensiva. Além disso, são causadores de infecções urinárias, trato respiratório, sítio cirúrgico, endocardites, pneumonia necrotizante, abscessos hepáticos e endoftalmite. Há muito tempo se conhece a capacidade do gênero *Klebsiella* spp em carrear mecanismos de resistência, causando perda da sensibilidade às cefalosporinas, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Entretanto, sua capacidade demonstrada nos últimos anos em adquirir, carrear e disseminar  $\beta$ -lactamases do tipo carbapenemase por meio de elementos genéticos móveis (plasmídeos e integrons) surpreendeu

os profissionais clínicos e exigiu vigilância especial dos serviços de controle de infecção sobre essa bactéria (17).

### 3. Principais $\beta$ -lactamases identificadas nas bactérias avaliadas

$\beta$ -lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam compostos com anel  $\beta$ -lactâmico na molécula, os quais estão presentes na maior classe de antimicrobianos usados na clínica. Conforme recente revisão, existem quase 2800  $\beta$ -lactamases descritas e são classificadas de acordo com as propriedades moleculares e sequência de aminoácidos, estando distribuídas em quatro grupos distintos (A, B, C e D), conforme a classificação de Ambler (18). As  $\beta$ -lactamases dos grupos A (TEM-1; SHV-1; CTX-M; ESBLs; CARB-1; KPC; SME), C (AmpC; CMY; GC1) e D (OXAs) utilizam um aminoácido de serina no sítio ativo para catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e podem ser inibidas por alguns fármacos utilizados na clínica (ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam, avibactam), entre outros. Já as enzimas pertencentes ao grupo B (IMP; VIM; SPM; NDM) chamadas de metalo-beta-lactamases utilizam um ou dois ions  $Zn^{2+}$  no sítio ativo para catalisar a hidrólise, sendo bloqueadas nos testes laboratoriais pelos quelantes de metais, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido 2-mercaptopropiônico (18-20).

#### 3.1. *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

KPCs são  $\beta$ -lactamases do grupo A de Ambler que conferem resistência aos patógenos contra os antimicrobianos monobactâmicos, penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A origem da denominação KPC está relacionada à *Klebsiella pneumoniae*, de onde essa enzima foi isolada e identificada inicialmente, embora essas enzimas sejam encontradas atualmente em outras espécies de bactérias Gram negativas com grande diversificação contando com 39 variantes [[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene\\_family:\(blaKPC\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:(blaKPC)) com acesso 13 de julho de 2019]; das quais KPC-2 e KPC-3 são as mais detectadas (21).

A maior preocupação causada na clínica pela enzima KPC é sua capacidade em degradar carbapenêmicos, considerados agentes estáveis à ação da maioria das  $\beta$ -lactamases de importância clínica e reservados normalmente como última opção entre os antimicrobianos. Essas enzimas não são bloqueadas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases tradicionais com anel  $\beta$ -lactâmico na molécula, como tazobactam, sulbactam ou ácido clavulânico, mas somente pela segunda geração de inibidores de  $\beta$ -lactamase, como os diazabicyclooctanos e ácido farmacofórico borônico cíclico, exemplificados pelo avibactam e vaborbactam, respectivamente (22).

O fato dos patógenos produtores de KPC serem normalmente resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR) é justificado pela possível transferência horizontal do gene *bla*<sub>KPC</sub> por meio de grandes plasmídeos, que são capazes de carrear também determinantes de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, entre outros (21). Outra característica marcante da resistência mediada por genes *bla*<sub>KPC</sub> é sua grande capacidade de disseminação. A primeira *K. pneumoniae* portadora de *bla*<sub>KPC</sub> foi isolada em 1996 nos EUA de um paciente do estado da Carolina do Norte, e na sequência a enzima foi encontrada em 1998 em isolado de *Salmonella cubana* de um paciente de Maryland, e em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* em pacientes internados em Baltimore e New York, respectivamente. Nos anos de 2000 – 2001 foi notificado em New York o primeiro surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC-3 envolvendo 14 pacientes, dos quais 8 morreram decorrentes da infecção. No mesmo período, alguns hospitais em New York reportaram que aproximadamente 50% das *K. pneumoniae* eram portadoras de *bla*<sub>KPC</sub> (21,23).

Os fatores de risco associados à infecção por patógenos produtores de KPC incluem a longa permanência em unidades de terapia intensiva, internação em locais endêmicos de bactérias produtoras de KPC, quantidade de comorbidades e nível de gravidade, uso anterior de antimicrobianos e o uso prolongado de dispositivos invasivos (24).

### 3.2. Metallo-Beta-Lactamases (MBL)

As MBLs são carbapenemases que conferem resistência contra todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção do aztreonam, e que necessitam de íons zinco como catalizador da ativação de uma molécula de água para hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, tornando-o ineficaz (19). Esse mecanismo enzimático de resistência foi descoberto na década de 1960 em espécies de baixo potencial patogênico, não sendo valorizado na clínica por muitos anos. Entretanto, somente após os anos de 1990 com o aparecimento dos surtos por bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacteriaceae*) contendo genes codificadores de MBLs em seus elementos móveis de DNA, e que culminou na disseminação internacional de patógenos produtores de MBLs, essa resistência recebeu a devida importância clínica e atenção dos grupos de pesquisa (25,26).

Segundo a classificação de Bush, as MBLs fazem parte do grupo B e estão divididas em 3 subgrupos (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>). Os subgrupos B<sub>1</sub> e B<sub>3</sub> utilizam dois íons  $Zn^{2+}$  e o subgrupo B<sub>2</sub> utiliza apenas um íon  $Zn^{2+}$  para hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico. O subgrupo B<sub>4</sub> foi recentemente descrito e está sendo estudado. Quase todos os patógenos encontrados com MBLs adquiridas possuem o subgrupo B<sub>1</sub>, demonstrando que esse apresenta maior propensão para ser propagado pelos elementos móveis de DNA que os outros subgrupos. Até 2018, no mínimo nove classes de

MBLs foram descritas e as classes IMP, VIM, NDM e SPM são as que apresentam maior prevalência e relevância clínica (19,25).

Atualmente, o problema mais importante envolvendo MBLs é a falta de algum tipo de fármaco efetivo liberado para uso clínico (inibidor de  $\beta$ -lactamase, antimicrobiano ou combinação de antimicrobianos) no combate das infecções causadas por patógenos produtores dessas enzimas. Mesmo o aztreonam, que não sofre hidrólise por essas enzimas tem sua ação inibida, pois patógenos produtores de MBLs porque normalmente hospedam um complexo padrão de multirresistência composto por algum outro tipo (enzimático, permeabilidade, bomba de efluxo, alteração de receptor), impedindo assim a ação desse antimicrobiano (18).

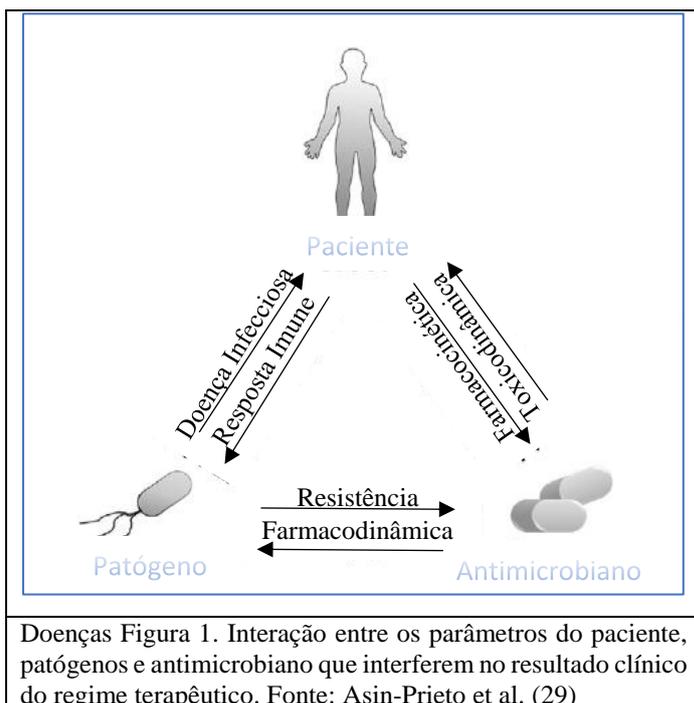
O controle da disseminação das bactérias MDR produtoras de KPC e MBL entre pacientes é realizada por meio de pacotes de medidas que incluem, sobretudo, a lavagem das mãos e uso de antissépticos antes e após assistência ao paciente, banho de clorhexidina, precauções de contato, limpeza do ambiente, culturas de vigilância, e treinamento dos profissionais da saúde conscientizando do problema e como mitigá-lo (27, 28).

#### **4. Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD): princípios**

Os resultados clínicos desejáveis da terapêutica antimicrobiana são alcançados por meio da concentração adequada do antimicrobiano no sítio da infecção. O fármaco quando administrado é submetido aos processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, sendo algum desses dependentes da via de administração. Convencionalmente, farmacocinética é denominada de “*o que o corpo faz com o fármaco*”, e parâmetros de *clearance*, volume de distribuição, ligação proteica, biodisponibilidade, relacionados às características do antimicrobiano e às condições fisiopatológicas dos pacientes, podem interferir nesses processos e consequentemente na concentração (29,30).

O efeito antimicrobiano tanto no patógeno causador da infecção, microbiota, e até mesmo nos tecidos, é definido como ação farmacodinâmica, e que convencionalmente é conhecida como “*o que o fármaco faz no corpo*”, ou no microrganismo considerando os antimicrobianos (29).

O maior indicador do efeito antimicrobiano é expressado pelo valor da MIC, que demonstra o quanto é susceptível o patógeno. Entretanto, tomar decisões terapêuticas baseadas apenas na MIC, que é fornecida por teste laboratorial de concentração estática em ambiente controlado, pode conduzir os profissionais de saúde a erros (30, 31). Resultados clínicos são condicionados por complexas interações entre vários parâmetros incluídos nos três elementos: paciente; patógeno; antimicrobiano (figura 1) (29).



Análise farmacodinâmica ou avaliação por PK/PD da terapia antimicrobiana, integra as informações desses elementos e possibilita os profissionais clínicos selecionar o melhor antimicrobiano e seu regime de dose, individualizado para o processo infeccioso e paciente, proporcionando assim maior probabilidade de sucesso terapêutico, minimizando a incidência de efeitos colaterais e a emergência de resistência. A relação quantitativa entre os parâmetros farmacocinéticos do paciente, regime de dose do antimicrobiano, e a MIC do antimicrobiano para o patógeno está definida como índice de PK/PD (ou índice farmacodinâmico), e seu valor alvo (magnitude) deve ser atingido pelo regime para maior eficácia terapêutica (30).

Os três índices de PK/PD associados com o efeito antimicrobiano são os seguintes:  $\%fT > MIC$ : percentagem do período de tempo entre as doses que a concentração livre do antimicrobiano permanece acima da MIC (para o qual, manter concentrações do antimicrobiano sobre a MIC por maior período entre as doses resultará em maior efetividade terapêutica);  $C_{max}/MIC$ : razão da concentração máxima da dose antimicrobiana pela MIC (para o qual, regimes que forneçam maiores picos séricos resultaram em maior sucesso terapêutico);  $AUC_{24h}/MIC$ : razão da área sob a curva do regime de dose de 24 horas pela MIC (para o qual, regimes que forneçam maiores AUC em 24 horas resultara em maior sucesso terapêutico) (figura 2). O tipo de índice de PK/PD e seus valores alvos podem variar, dependendo do antimicrobiano, patógeno envolvido e condições do paciente (29).

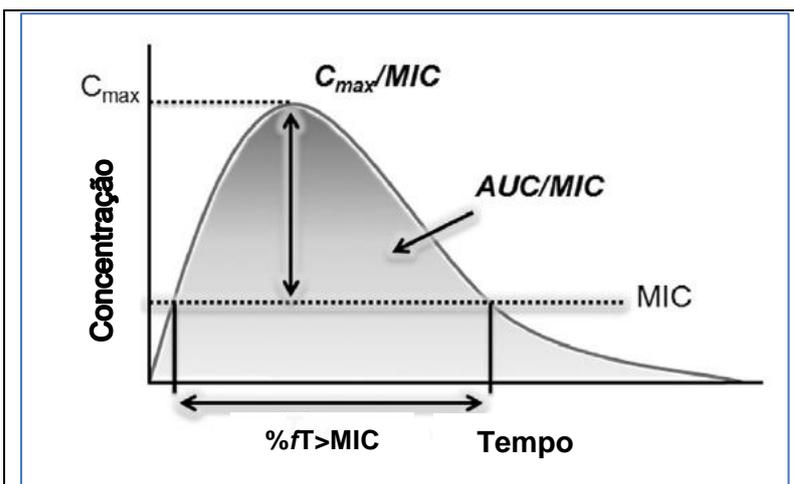


Figura 2. Gráfico de concentração x tempo demonstrando os três índices de PK/PD:  $C_{max}/MIC$ ;  $AUC/MIC$ ;  $\%fT > MIC$ . Fonte: Asin-Prieto et al. (29)

A eficácia do fármaco depende do padrão de atividade antimicrobiana, que está dividida em três tipos (30):

- Concentração dependente com efeito pós antibiótico prolongado: apresenta ação antimicrobiana caracterizada melhor pelos seguintes índices de PK/PD:  $C_{max}/MIC$  ou  $AUC_{24h}/MIC$  (ex. aminoglicosídeos, fluorquinolonas, polimixinas, metronidazol);
- Tempo dependente com nenhum ou pouco efeito pós antibiótico: apresenta ação antimicrobiana caracterizada pelo índice de PK/PD,  $\%fT > MIC$  (ex.  $\beta$ -lactâmicos);
- Concentração independente com efeito pós antibiótico prolongado: apresenta ação antimicrobiana caracterizada pelos índices de PK/PD,  $C_{max}/MIC$  ou  $AUC_{24h}/MIC$  (ex. glicopeptídeos; oxazolidinonas; tetraciclina; macrolídeos) (30).

A (tabela 1) exemplifica alguns antimicrobianos, índices PK/PD e seus respectivos valores de magnitude para serem alcançados nos regimes posológicos (29,30,32).

Tabela 1. Antimicrobianos, índices de PK/PD e respectivos valores alvos da posologia no paciente (29,30,32).

Antimicrobiano	Índice PK/PD	Valor alvo (magnitude)
Penicilinas	$\%fT > MIC$	50 - 60%
Cefalosporinas	$\%fT > MIC$	60 – 70%
Carbapenens	$\%fT > MIC$	40 - 50%
Aztreonan	$\%fT > MIC$	60 - 70%
Aminoglicosídeos	$C_{max}/MIC$	$\geq 10$
Quinolonas (contra Gram negativos)	$AUC_{24h}/MIC$	125
Vancomicina	$AUC_{24h}/MIC$	400
Teicoplanina	$AUC_{24h}/MIC$	$\geq 800$
Macrolídeos	$\%fT > MIC$	25
Daptomicina	$AUC_{24h}/MIC$	666
Tigeciclina	$AUC_{24h}/MIC$	17.9
Linezolida	$AUC_{24h}/MIC$	100
Colistina	$\%fT > MIC$	27.6 – 45.9
Fosfomicina	$AUC_{24h}/MIC$	40.8

$\%fT > MIC$ , percentagem do período de tempo entre as doses que a concentração livre do antimicrobiano permanece acima da MIC;  $C_{max}/MIC$ , razão da concentração máxima do regime antimicrobiano pela MIC;  $AUC_{24h}/MIC$ , razão da área sob a curva do regime de dose de 24 horas pela MIC.

#### 4.1. Simulação de Monte Carlo

Um dos objetivos mais importantes na seleção do regime antimicrobiano é o alcance do valor alvo do índice PK/PD no paciente. Entretanto, existem incertezas nesse cenário envolvendo as variabilidades farmacocinéticas do paciente, a MIC do possível patógeno, solubilidade do fármaco, viabilidade do sistema imune, entre outras, que interferem no alcance desse índice (29). Simulação de Monte Carlo é um método estatístico amplamente utilizado para avaliar a probabilidade de alcançar um determinado objetivo em vários campos onde existem incertezas (economia, mineração, jogos de azar, farmacologia, entre outros) (33,34)

Na terapia antimicrobiana, esse método inclui nas análises os parâmetros envolvidos e suas variabilidades (incertezas), avaliando a probabilidade de alcançar o alvo (PTA) do regime antimicrobiano contra MICs sequenciais, em uma população virtual simulada por programas computacionais específicos. O alvo no caso seria o valor do índice de PK/PD. Esse método é atualmente utilizado para avaliar os seguintes aspectos:

- O alcance de fármacos em desenvolvimento e auxiliar no planejamento posológico de fases posteriores do estudo;
- Novos regimes de fármacos já estabelecidos na clínica;
- Contribuir nas análises dos comites *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* para definir os *breakpoints* de sensibilidade aos antimicrobianos;
- Estabelecer regimes posológicos para populações específicas de pacientes (ex. sépticos, infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva, neutropenia febril, combater patógenos específicos, entre outros) (29,35-37).

#### 4.2. Fração cumulativa de resposta (CFR)

Como definição, CFR é a soma dos resultados da multiplicação das PTAs do regime pela frequência da população dos microrganismos distribuídos nas respectivas MICs, o qual fornece o alcance (%) do regime antimicrobiano contra a população dos patógenos avaliados. Comparativamente, quanto mais próximo de 100%, melhor será o alcance do regime contra a população microbiológica avaliada (29,30).

#### 4.3. PK/PD e *breakpoints* de susceptibilidade.

A definição dos valores de *breakpoints* de susceptibilidade está apoiada no critério da probabilidade de sucesso ou insucesso terapêutico contra determinado patógeno e são considerados críticos porque guiam os profissionais clínicos na seleção ou exclusão dos antimicrobianos. Um valor inadequado de *breakpoint* pode causar falha terapêutica ou exclusão de um antimicrobiano potencialmente efetivo. Atualmente, os comites CLSI e EUCAST definem os *breakpoints* baseado em três tipos de informações:

- Distribuição das MICs das “espécies selvagens”;
- Alcance antimicrobiano por PK/PD (*breakpoints* por PK/PD);
- Dados de resposta clínica (29).

As metodologias utilizadas para definir os *breakpoints* de susceptível por PK/PD são as seguintes:

- a) Maior valor da MIC que o regime antimicrobiano fornece PTA  $\geq 90\%$  (figura 3 a);
- b) Maior valor da MIC alcançado pelo regime no índice farmacodinâmico com intervalo de confiança  $\geq 80\%$  (figura 3 b).

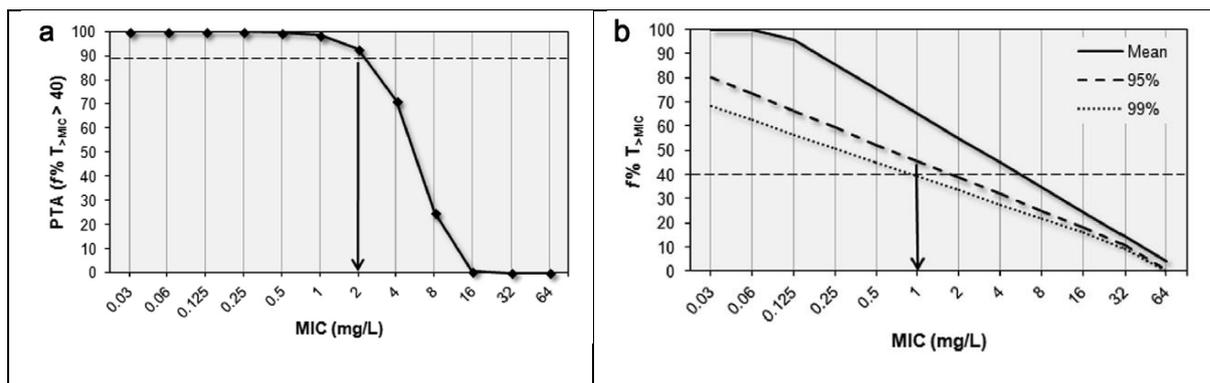


Figura 3. Métodos usados pelo EUCAST para estimar os *breakpoints* de susceptibilidade por meio de PK/PD usando um carbapenêmico, como exemplo (alvo: %fT>MIC,  $\geq 40\%$ ). **a**: método por meio de PTA  $\geq 90\%$  e o valor estimado do *breakpoint* susceptível (MIC  $\leq 2$ mg/L); **b**: método por meio do índice de PK/PD com intervalo de confiança de 95% e o valor estimado do *breakpoint* susceptível (MIC  $\leq 1$  mg/L). Fonte: Asin-Prieto et al. (29)

Os estudos realizados comparando os *breakpoints* por PK/PD versus *breakpoints* publicados pelos comites demonstraram concordâncias, como também discrepâncias de até 1/8 dos *breakpoints* publicados. Quando o *breakpoint* por PK/PD for maior que o valor do *breakpoint* publicado, poderá haver maior probabilidade de falha terapêutica, mas quando o *breakpoint* por PK/PD for menor que o publicado, o isolado poderá ser sensível ao antimicrobiano que está definido como resistente no *breakpoint* publicado (29).

#### 4.4. PK/PD dos antimicrobianos e resistência microbiana.

A crise da resistência microbiana é atribuída, sobretudo, ao uso indevido dos antimicrobianos, e fazem parte desse problema o uso excessivo de regimes antimicrobianos que produzem concentrações subinibitórias ou subterapêuticas que podem promover alterações genéticas, resultando no aumento da resistência, virulência e disseminação do patógeno. Dentro dos conceitos de PK/PD, a associação da supressão de resistência foi estudada com os índices conhecidos tradicionalmente (%fT>MIC;  $C_{max}/MIC$ ;  $AUC_{24h}/MIC$ ), como também a razão da concentração mínima pela MIC ( $C_{min}/MIC$ ), e outros índices idealizados utilizando o conceito de concentração de prevenção de mutantes (MPC) ( $AUC_{24h}/MPC$ ,  $C_{max}/MPC$ , %T>MPC), os quais são exclusivos para avaliar o potencial de desenvolvimento de resistência do regime antimicrobiano (38,39).

#### 5. Combinação antimicrobiana e testes de sinergismo.

Avaliar a combinação *in vitro* com concentrações estáticas de dois ou mais antimicrobianos e classificar a magnitude da ação combinada, ainda é um grande desafio para os pesquisadores. Existem vários métodos para avaliar a ação sinérgica das combinações, mas os mais usados são os testes de “checkerboard” utilizando a equação do índice da fração da

concentração inibitória (FICI), e o “tempo de curva de morte”. Testes baseados na teoria da resposta de superfície, também são utilizados (40-44).

No teste *in vitro* por *checkerboard*, as MICs dos antimicrobianos sozinhos ou em combinação são determinadas por microdiluição em placas de 96 poços utilizando inóculo do patógeno na concentração final de  $5 \times 10^5$  CFU/mL. As microplacas são incubadas a 37 °C por 18 – 20 horas. As MICs fornecidas no *checkerboard* são utilizadas na equação de FICI, descrita abaixo:

$$FICI = \frac{MIC \text{ (antimicrobiano y combinado)}}{MIC \text{ (antimicrobiano y sozinho)}} + \frac{MIC \text{ (antimicrobiano z combinado)}}{MIC \text{ (antimicrobiano z sozinho)}}$$

A classificação da magnitude da ação entre os antimicrobianos é classificada de acordo com FICI:  $FICI \leq 0.5$ , sinergismo;  $0.5 < FICI \leq 4$ , indiferente; and  $FICI > 4$ , antagonismo (42).

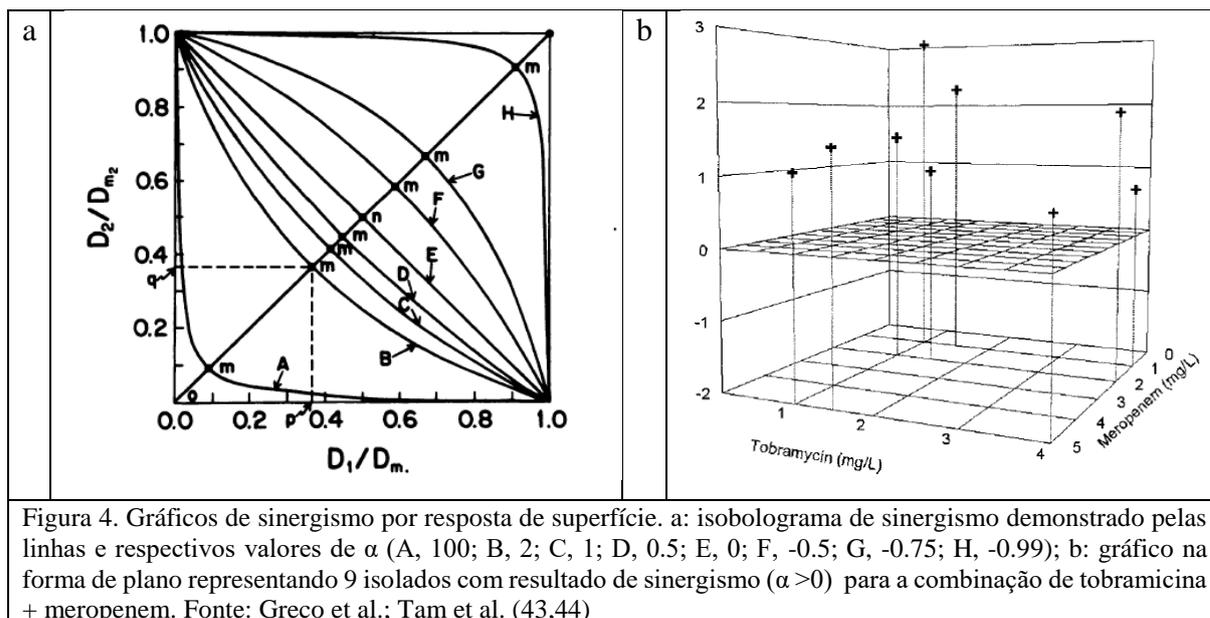
No teste *in vitro* por tempo de curva de morte, a combinação de antimicrobianos será considerada sinérgica quando causar redução maior na quantidade de colônias de no mínimo 2  $\log_{10}$  de UFC/mL em 24 horas, comparado ao antimicrobiano de maior ação testado sozinho (41).

Uma outra perspectiva para avaliar a ação sinérgica entre fármacos seria por meio da teoria da resposta de superfície, que pode ser demonstrada por meio de isoblograma ou um plano (Figura 4). Um dos métodos que está baseado nessa teoria é o teste do “índice de aditividade de Loewe” que utiliza as MICs geradas no teste de *checkerboard*, e a magnitude da ação sinérgica da combinação dos antimicrobianos depende do valor de  $\alpha$ , fornecido pela seguinte equação:

$$1 = \left( \frac{MIC \text{ (antimicrobiano y combinado)}}{MIC \text{ (antimicrobiano y sozinho)}} + \frac{MIC \text{ (antimicrobiano z combinado)}}{MIC \text{ (antimicrobiano z sozinho)}} \right) + \alpha$$

A classificação do efeito gerado pela combinação dos antimicrobianos será de acordo com o valor de  $\alpha$ :  $\alpha > 0$ , sinergismo;  $\alpha = 0$ , aditivo;  $\alpha < 0$ , antagonismo (43).

Os resultados dos testes por meio de aditividade de Loewe são mais pragmáticos (objetivos), quando comparado ao teste de FICI, que apresenta uma grande margem de valores entre o sinergismo e antagonismo, classificado como indiferente.



## 6. Tratamento das infecções por patógenos KPC e MBLs

Opções antimicrobianas para combater infecções causadas por patógenos produtores de KPC são poucas, e seus resultados ainda são fracos e/ou limitados. Para combater infecções causadas por patógenos produtores de MBLs, conforme apontado anteriormente, ainda não existe um fármaco efetivo, sendo normalmente utilizados antimicrobianos antigos (como as polimixinas e aminoglicosídeos) com *breakpoints* e farmacocinética duvidosos, baseados geralmente em avaliações *in vitro*, pequenos estudos clínicos e relatos de caso (21,26).

### 6.1. Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem, biapenem, panipenem, ertapenem) pertencem à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, e como tal, ligam-se às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e impedem a biossíntese da parede celular, causando a morte do microrganismo. No entanto, de maneira geral, diferenciam-se dos outros  $\beta$ -lactâmicos por apresentarem maior potência e amplo espectro de ação (Gram positivos, Gram negativos e anaeróbios), e a cadeia lateral trans-1-hydroxyethyl presente nas suas moléculas fornece maior estabilidade à ação das enzimas ESBL. Como os carbapenêmicos exercem ação farmacodinâmica tempo dependente, que pode ser ampliada pela maximização da concentração livre do antimicrobiano sobre a MIC do patógeno ( $\%fT > MIC$ ), regimes otimizados com doses diárias maiores e mais fracionadas, administradas por meio de infusão estendida ou contínua,

forneem melhores coberturas farmacodinâmicas, particularmente com as moléculas com tempo de meia vida curto (34,45,46).

Vários estudos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e clínicos, demonstram os benefícios da otimização dos regimes de carbapenêmicos, principalmente contra patógenos produtores de carbapenemase e com MICs mais elevadas (2 – 16 µg/mL) (34,39,46-48).

### **6.1.1. Combinação de carbapenêmicos**

Embora seja racionalmente estranho usar carbapenêmicos no combate à bactérias produtoras de carbapenemases (bactérias KPC), uma vez que essas enzimas são capazes de hidrolisá-los, estudos *in vitro*, *ex vivo* e clínicos demonstram bons resultados utilizando regimes carbapenêmicos otimizados em altas doses por infusão estendida, combinados com outros agentes contra bactérias produtoras de KPC, particularmente contra MICs moderadamente elevadas (39,47).

A combinação do ertapenem com outro antimicrobiano carbapenêmico também é utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias KPC, e seu princípio está na maior afinidade da enzima carbapenemase ao ertapenem por meio de uma ligação suicida, deixando assim o outro carbapenêmico livre para combater o patógeno (49). Um bom exemplo do benefício potencial dessa terapia está demonstrado no estudo caso controle com 144 pacientes apresentando infecção por *K. pneumoniae*, das quais 90% eram produtoras de carbapenemases, que comparou a combinação dupla de carbapenêmicos associada a outro agente versus dupla ou tripla combinação de outros antimicrobianos não carbapenêmicos, e encontrou menor taxa de mortalidade em 28 dias ( $p = 0,04$ ) nos pacientes que receberam a terapia de carbapenêmicos combinados (50).

### **6.1.2. Carbapenêmicos no combate de patógenos produtores de MBLs**

O uso de carbapenêmicos para combater infecções causadas por patógenos produtores de MBLs é bastante controverso e discutido na clínica, principalmente porque essas enzimas também degradam carbapenêmicos. Antimicrobianos contra patógenos produtores de MBLs podem apresentar valores de MICs até menores que os *breakpoints* de sensibilidade, principalmente contra *Enterobacteriaceae*, e embora os comitês CLSI e EUCAST afirmem que o *breakpoint* de sensibilidade para carbapenêmicos são suficientes para o manejo clínico, a dúvida ainda permanece se são aplicáveis em infecções causadas por patógenos MBLs (19,35,36). Estudo utilizando modelo de infecção com pata de rato mostrou que imipenem foi

efetivo contra *K. pneumoniae* produtora de MBLs VIM-1 com valores de MICs de 2 – 4 µg/mL (51).

Relatos de casos clínicos descrevem resultados conflitantes mostrando sucesso terapêutico ou falhas de tratamento com o uso de carbapenêmicos contra infecções causadas por patógenos produtores de MBLs, direcionados por resultado sensível de antibiograma (19). Carbapenêmicos em combinação com outras classes de antimicrobianos contra infecções causadas por patógenos produtores de MBLs mostrou menor taxa de mortalidade quando comparado ao uso de carbapenêmicos em monoterapia (51).

## 6.2. Polimixinas

As polimixinas (polimixina B e colistina) são antimicrobianos polipeptídeos que atuam desestabilizando a membrana externa causando a morte celular bacteriana, e apresentam ação farmacodinâmica concentração dependente demonstrada pelo IF  $AUC_{24h}/MIC$ . São antimicrobianos antigos, utilizados inicialmente na clínica desde a década de 1950, e por causarem considerável taxa de toxicidade renal e neurológica somada ao desenvolvimento de antimicrobianos mais seguros, suas formulações intravenosas foram descontinuadas com o tempo. Entretanto, em consequência do aparecimento de bactérias Gram negativas MDR resistentes aos carbapenêmicos e sensíveis *in vitro* a esses polipeptídeos, principalmente *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, as polimixinas foram resgatadas para a clínica como último recurso terapêutico (52).

A característica indesejável das polimixinas, conforme demonstrada *in vitro* pela eliminação dos isolados sensíveis e a amplificação da subpopulação heterorresistente, sugere que esses antimicrobianos em monoterapia podem causar emergência de resistência, devendo ser usados na clínica em associação com outros agentes (52,53). Embora exista essa recomendação, estudo clínico recente avaliando a combinação de colistina com meropenem versus colistina em monoterapia contra bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenêmicos, coloca em dúvida a superioridade da combinação sobre a monoterapia com polimixinas (54).

O fato das polimixinas terem sido desenvolvidas e usadas há muito tempo, quando ainda a eficácia das metodologias, equipamentos e as exigências regulatórias nos estudos pré-clínicos e clínicos de fármacos eram insuficientes, comparado aos atuais, causa desconfiança nos profissionais clínicos quanto às informações e recomendações de bula que ainda não foram atualizadas, principalmente sobre a posologia e vias de excreção (21).

O colistimetato sódico (pró-fármaco da colistina) é eliminado exclusivamente pela via renal, diferente da colistina (fármaco ativo) que é eliminada principalmente por via extra-renal. Pacientes com boa função renal excretam aproximadamente 60% do fármaco administrado na forma de colistimetato, e apenas 30% são transformados por hidrólise em colistina. Sendo assim, a quantidade de colistina formada é dependente do colistimetato sérico, que por sua vez depende diretamente da função renal do paciente. A colistina apresenta uma variabilidade farmacocinética de 10 vezes entre as faixas de *clearance* de creatinina, diferente da polimixina B que apresenta uma variabilidade de 3 – 4 vezes. Portanto, o perfil farmacocinético do colistimetato dificulta alcançar concentrações séricas adequadas da colistina nos pacientes com *clearance* de creatinina  $\geq 80$  mL/min, como também, alcançar concentrações efetivas no sítio pulmonar nesses pacientes, e a alternativa de aumentar a dose diária de colistimetato pode elevar o risco de nefrotoxicidade desse antimicrobiano (55-57). Outra informação infundada constando na bula da polimixina B é a recomendação de ajustes posológicos de acordo com as faixas de disfunção renal, entretanto, esse antimicrobiano não é excretado por essa via, e caso seja seguida poderá causar concentrações sub inibitórias (57).

### **6.2.1. Polimixinas e patógenos produtores de KPC e MBL**

Polimixinas são normalmente a única classe de antimicrobianos disponível em que os patógenos produtores de KPC e MBL são sensíveis. Sabuda et al. (58) relatou a avaliação de 12 pacientes com pneumonia hospitalar e pneumonia associada a ventilação mecânica causadas por *P. aeruginosa* produtoras de MBLs e tratados com colistina pela via intravenosa combinada com aztreonam ou piperacilina + tazobactan, dos quais 8 ( $\approx 67\%$ ) apresentaram resultado favorável. Souli et al. (59) avaliaram 17 pacientes com bacteremia ou pneumonia associada a ventilação mecânica causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de MBLs, e verificou que 11 (85%) dos 13 pacientes que receberam colistina intravenosa apresentaram sucesso terapêutico. Importante ressaltar que as espécies de *Proteus*, *Serratia* e *Providencia* apresentam resistência natural às polimixinas.

### **6.3. Fosfomicina**

Antimicrobiano fosfônico de estrutura molecular diferente das outras classes de agentes, administrada pelas vias intravenosa e oral por formulações distintas. Apresenta ação bactericida de amplo espectro pela inibição da enzima fosfoenolpiruvato transferase, levando o bloqueio da formação da parede celular e consequente morte do microrganismo. A baixa biodisponibilidade ( $\approx 40\%$ ) fornecida pela formulação oral limita sua indicação, sendo utilizado

apenas contra infecções urinárias baixas sem gravidade e em dose única diária. No entanto, as apresentações intravenosas são indicadas contra infecções graves e sistêmicas em posologias de 12 – 24 g ao dia, divididas em 3 a 4 vezes. Sua pequena molécula e ligação proteica insignificante favorecem a distribuição em concentrações efetivas por todos os tecidos e sua característica bastante hidrofílica favorece a excreção pela via renal de forma inalterada, sendo orientada a redução nas doses diárias em pacientes com clearance de creatinina  $< 40$  mL/min. Esse mesmo perfil farmacocinético propicia também sua remoção durante os diferentes tipos de hemodiálise, exigindo atenção dos clínicos quanto a necessidade das doses adicionais de reposição (60,61).

Quanto aos *breakpoints* de sensibilidade para a fosfomicina, existem diferenças importantes entre os comitês CLSI e EUCAST. O CLSI define apenas *breakpoints* para *E. coli* isoladas no sítio urinário e considerando sensível MICs  $\leq 64$   $\mu$ g/ml. Entretanto, o EUCAST define *breakpoints* para as enterobactérias isoladas em qualquer sítio de infecção e considera sensível MICs  $\leq 32$   $\mu$ g/ml. Nenhum dos comitês define valor de *breakpoints* para *P. aeruginosa* (35,36).

A ação farmacodinâmica da fosfomicina foi classificada até alguns anos atrás como tempo dependente ( $\%fT > MIC$ ) (62). Entretanto, estudos mais recentes *in vivo* evidenciaram que sua ação responde com características de concentração dependente, com IF  $AUC_{24h}/MIC$  com valores alvos  $\geq 23,7$  e  $\geq 40,8$  para *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente (63). Como existe a possibilidade da emergência de resistência durante o tratamento de patógenos inicialmente sensíveis, principalmente a família *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*, é recomendado que a terapêutica com fosfomicina seja combinada com outros antimicrobianos contra infecções sistêmicas para evitar esse problema (64-66).

Diante da escassez de opções nos últimos anos para combater infecções causadas por patógenos MDR produtores de carbapenemase, antimicrobianos antigos como a fosfomicina estão sendo resgatados para a clínica porque são frequentemente ativos contra essas bactérias. Essa boa sensibilidade está justificada por fatores como a diferença molecular em relação aos outros agentes, que dificulta a resistência cruzada e facilita o sinergismo pelos sítios de ação distintos, além do uso clínico infrequente reduzindo a pressão seletiva de resistência. Embora sua formulação oral seja indicada apenas contra infecções urinárias baixas não complicadas, a comum sensibilidade à fosfomicina das bactérias produtoras de KPC isoladas nesse sítio e a indisponibilidade da formulação intravenosa em muitos países, tornam a apresentação oral uma opção contra infecções urinárias causadas por esses microrganismos. Estudos *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo* e clínicos avaliando a ação da fosfomicina combinada com diferentes classes de

antimicrobianos demonstraram os potenciais benefícios desse agente contra patógenos produtores de KPC (39,67-70).

### **6.3.1. Fosfomicina e patógenos produtores de MBLs.**

Embora fosfomicina seja recomendada como potencial opção terapêutica no tratamento de pacientes com infecção causada por patógenos produtores de MBLs, são escassos os estudos clínicos que confirmam essa eficácia, sendo o uso baseado normalmente em relatos de caso (19). Guerin et al. (71) trataram com sucesso um paciente com prostatite causada por *P. aeruginosa* MBLs usando o regime combinado de fosfomicina com aztreonam, como também, Seija et al. (72) que obtiveram sucesso no tratamento de um paciente com sepse causada por *Morganella morgani* produtora de nova deli metalo-beta-lactamase (NDM) com regime combinado de fosfomicina com meropenem. Recentemente, Rosa et al. (73) relataram sucesso no tratamento de uma paciente com infecção no trato urinário por *K. pneumoniae* produtora de NDM utilizando a combinação de carbapenens (meropenem + ertapenem) associado com fosfomicina oral.

### **6.4. Aminoglicosídeos.**

Os aminoglicosídeos fazem parte do grupo dos “velhos” antimicrobianos que comumente os patógenos produtores de carbapenemases expressam sensibilidade (74). Aminoglicosídeos parenterais como amicacina, gentamicina e tobramicina são agentes introduzidos na clínica desde a década de 1940, atuam preferencialmente em microrganismos Gram negativos pela ação na porção 30S do ribossomo e inibem a produção de proteínas, que são vitais para a manutenção da célula microbiana. Apresentam como características farmacocinéticas um volume de distribuição (VD) pequeno (0,2 – 0,3 L/kg), curto tempo de meia vida (2 – 3 horas), baixa ligação proteica (<10%), altamente hidrofílicos, o que impede a absorção oral e obriga o uso apenas das vias parenteral e inalatória, e são excretados pela via renal de forma inalterada. As posologias recomendadas para gentamicina e tobramicina são 5 – 7 mg/kg (dose única/dia) ou 1,7 – 2 mg/kg a cada 8 horas (q8h), e para amicacina são 15 – 20 mg/kg (dose única/dia) ou 7,5 mg/kg q12h. Os aminoglicosídeos são utilizados em monoterapia apenas contra infecções urinárias leves por alcançarem altas concentrações nesse sítio. Entretanto, no combate de infecções urinárias graves ou fora desse sítio, devem ser utilizados sempre em combinação com outras classes de antimicrobianos. Esses fármacos atingem concentrações distintas nos diferentes tecidos. Maior afinidade e distribuição no tecido

muscular em relação ao adiposo, recomenda-se considerar apenas 40% do peso do tecido adiposo no cálculo posológico. O mínimo alcance no sistema nervoso central impedem sua indicação para o tratamento de meningites, como também, deve haver cuidado na posologia contra infecções pulmonares porque apenas  $\approx 70\%$  da concentração sérica alcança esse sítio de infecção (56,74,75).

Quanto à segurança, esses fármacos são considerados potencialmente tóxicos e com estreita janela terapêutica. A disfunção renal é a toxicidade mais frequente ( $\approx 20\%$ ), que normalmente é revertida com a rápida suspensão do aminoglicosídeo. Entretanto, a deficiência auditiva é a toxicidade mais preocupante e, mesmo sendo pouco frequente, é normalmente irreversível, podendo acontecer tardiamente após o tratamento. A razão da maior nefrotoxicidade dos regimes com múltiplas doses ao dia está na manutenção de baixas concentrações de vales durante o período de tratamento, favorecendo a penetração no tecido renal, o que não acontece nos regimes de dose única diária porque propiciam concentrações de vale indetectáveis. Outro marcador farmacocinético importante para a segurança no uso dos aminoglicosídeos quanto a nefrotoxicidade, baseia-se na área sob a curva de 24 horas ( $AUC_{24h}$ ) estimada do regime posológico utilizado. Regimes de gentamicina ou tobramicina com  $AUC_{24}$  de 70 – 100, e de amicacina com  $AUC_{24}$  de 210 – 300, apresentam menor probabilidade de causar nefrotoxicidade (76).

O efeito pós-antibiótico relevante dos aminoglicosídeos (3 – 4 horas *in vitro*;  $\approx 9$  horas *in vivo*), contribui na realização dos regimes de doses únicas diária, atuando no microrganismo mesmo no período em que a concentração permaneceu sob a MIC, tornando-se indetectável. A dose única diária não é recomendada especialmente em pacientes com farmacocinética instável, grandes queimados ( $>20\%$  do corpo), pacientes com endocardite e clearance de creatinina  $< 20$  mL/min. O monitoramento sérico dos aminoglicosídeos auxilia na maior efetividade terapêutica e segurança do paciente, devendo os regimes de gentamicina e tobramicina em doses múltiplas alcançarem concentrações de pico e vale de (5 – 8  $\mu\text{g/mL}$  e  $< 2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), e em dose única ( $\approx 20$   $\mu\text{g/mL}$  e indetectável, respectivamente), A amicacina por sua vez, regimes de dose múltipla devem alcançar pico e vale (20 – 30  $\mu\text{g/mL}$  e  $< 10$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e em dose única (60  $\mu\text{g/mL}$  e indetectável, respectivamente) (75,76). Pacientes críticos, especialmente aqueles em ventilação mecânica, apresentam aumento no VD dos aminoglicosídeos com conseqüente redução de  $C_{max}$ , como também, pode haver redução na taxa de filtração glomerular ampliando o tempo de meia vida, fatores pelos quais recomenda-se o monitoramento sérico nesses pacientes (56).

Os aminoglicosídeos nos conceitos de PK/PD comportam-se com característica concentração dependente, e a melhor eficácia clínica contra patógenos Gram negativos correlaciona com o IF  $C_{\max}/MIC$ , devendo os regimes alcançarem valores alvo  $\geq 8 - 10$ , sendo um grande desafio atingí-los contra patógenos produtores de KPC, porque quando sensíveis, normalmente apresentam elevadas MICs (77).

Embora exista certa frequência de bactérias produtoras de KPC sensíveis aos aminoglicosídeos em algumas regiões no mundo, muitas dessas apresentam MICs elevadas para essa classe de antimicrobianos, com valores iguais aos *breakpoints* ou apenas uma diluição menor, dificultando assim alcançar IF. Por exemplo, os valores dos *breakpoints* sensível do CLSI para amicacina e gentamicina são 16  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sendo que as  $C_{\max}$  recomendadas para seus regimes em dose única diária são de 60  $\mu\text{g/mL}$  e 20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (76). Dessa forma, usando hipoteticamente esses valores, os índices atingidos pelos regimes de amicacina seria  $\approx 3,7$  e para gentamicina  $\approx 5,0$ , os quais são considerados insuficientes (muito menores que 8 – 10). Além disso, somente regimes com doses diárias elevadas poderiam alcançar IF adequados (valores : 8 – 10) para esses *breakpoints*, os quais seriam inseguros para os pacientes. Esses resultados também colocam em dúvida os *breakpoints* definidos pelo CLSI, os quais devem ser reavaliados (35). Os comitês *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast) e o EUCAST, definem valores menores para os *breakpoints* sensível da gentamicina ( $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) e amicacina ( $MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$ ), e estes orientam que devem ser utilizados em combinação com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (36,54,76,78).

Sendo assim, a interpretação do resultado demonstrando que o patógeno produtor de carbapenemase é sensível ao aminoglicosídeo, deve ser realizada com muito cuidado, principalmente quando o patógeno for sensível apenas a essa classe. Nesse caso, o clínico deve utilizá-lo em doses máximas diárias e otimizadas, considerando o valor da MIC (74). Em uma revisão sistemática de 20 estudos clínicos de pacientes com infecções causadas por patógenos produtores de carbapenemases, a combinação de aminoglicosídeos com carbapenêmicos apresentou menor taxa de mortalidade (79). Satlin et al. (80), em estudo retrospectivo de cohort avaliaram pacientes com bacteriúria causadas por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e comparou as taxas de *clearance* microbiológico entre polimixina, tigeciclina e aminoglicosídeos em monoterapia, evidenciando que a última classe apresentou a maior taxa (88%), seguido de polimixina (64%) e tigeciclina (36%). Portanto, aminoglicosídeos em monoterapia apresentam potencial para combater patógenos carbapenêmicos resistentes em

infecções urinárias, provavelmente auxiliados pela alta concentração que atingem nesse sítio, o que não acontece com os outros dois antimicrobianos.

Para otimizar os aminoglicosídeos no sítio pulmonar, esses agentes podem ser aerosolizados, sendo recomendados no tratamento de pacientes com pneumonia, incluindo as causadas por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos (81).

#### **6.4.1. Aminoglicosídeos e patógenos produtores de MBLs**

Conforme apontado anteriormente, patógenos produtores de MBLs apresentam múltiplos mecanismos de resistência incluindo contra aminoglicosídeos, fazendo com que essa classe de agentes não seja efetiva em infecções causadas por esses patógenos. A resistência enzimática mediada pela 16 SrNA methyltransferases frequentemente está presente nesses microrganismos inativando os aminoglicosídeos, especialmente pelos patógenos produtores de NDM (82).

#### **6.5. Tigeciclina**

Tigeciclina é uma glicilciclina (derivada da minociclina) que pertence à classe das tetraciclinas, com atividade bacteriostática de amplo espectro, incluindo *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC. Atua na célula microbiana ligando-se a subunidade 30S do ribossomo bloqueando a entrada do RNA<sub>i</sub>, e consequente produção de proteínas vitais. Suas propriedades farmacocinéticas mais relevantes são um grande VD (7 – 9 L/kg), alta ligação proteica (73 – 79 %), excretada principalmente pela via biliar/fecal, longo tempo de meia vida ( $\approx 40$  horas) e baixo clearance (0,2 – 0,3 L/h/kg) (56).

Existe divergência entre os comitês para a definição dos *breakpoints* sensível para a tigeciclina, sendo definido nos EUA apenas pelo FDA ( $MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) e o EUCAST apresenta menor valor ( $MIC \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ). A tigeciclina é disponível apenas para a via intravenosa, em posologia recomendada de 100 mg (inicial) e 50 mg q12h como dose de manutenção. O índice farmacodinâmico que melhor correlaciona a eficácia da tigeciclina é  $AUC/MIC$ , e estudo em pacientes com pneumonia hospitalar e associada a ventilação mecânica demonstrou que  $fAUC/MIC \geq 0,9$  devem ser obtidos pelos regimes para alcançar maior probabilidade de eficácia clínica (35,36,56,78,83).

Os clínicos devem ter cuidado ao escolher tigeciclina no combate das infecções nos diferentes sítios, porque esse antimicrobiano apresenta limitações. Seu grande VD causa concentração insuficiente no combate de infecções de corrente sanguínea, podendo ser inferior a MIC para o patógeno. O fato de ser excretada primordialmente pela via biliar impede sua

indicação contra patógenos no sítio urinário. Estudo clínico em pacientes com pneumonia associada a ventilação comparou tigeciclina versus imipenem e demonstrou superioridade do carbapenêmico, causando preocupação quanto a possível subdose (21). Outros estudos que avaliaram regimes de tigeciclina combinados contra infecções por patógenos produtores de KPC demonstraram menor mortalidade ao comparador, entretanto, utilizaram o dobro das posologias recomendadas em bula. No entanto, posologias diárias maiores que as recomendadas aumentam as taxas de reações adversas alertadas em bula, principalmente as relacionadas ao sistema gastrointestinal (21,84).

## **7. Resistência bacteriana. Desafio para o desenvolvimento de novos antimicrobianos**

O aumento contínuo da resistência culminando nos atuais patógenos MDR, extensivamente resistente aos antimicrobianos (XDR) e resistentes a todos os antimicrobianos (PDR); a escassez de novos antimicrobianos causada em parte pelo desinteresse da indústria farmacêutica em pesquisar novas moléculas; a necessidade do resgate dos “antigos” antimicrobianos descontinuados na época pela toxicidade e/ou farmacocinética incerta; e os alertas das organizações OMS e CDC sobre o grave problema da resistência microbiana e suas consequências, foram fatores que sensibilizaram os governos dos EUA e a União Europeia a iniciarem os programas *Generating Antibiotic Incentives Now* (GAIN) e *Innovative Medicines Initiative* (IMI), respectivamente. Embora sejam programas independentes, apresentam objetivos comuns que incluem oferecer incentivos econômicos para desenvolver novos antimicrobianos e reduzir a resistência microbiana, acelerar os processos de avaliação e liberação de novas moléculas para o uso clínico, formar parcerias público-privadas para pesquisar novos agentes, e que contribuíram para o recente lançamento dos  $\beta$ -lactâmicos combinados com inibidores enzimáticos (ceftalozane + tazobactam; ceftazidima + avibactam,) e mais de 30 moléculas que estão em avaliação clínica (85,86).

## **8. Novos antimicrobianos para o combate de bactérias MDR**

- ( $\beta$ -lactâmicos + Inibidores de  $\beta$ -lactamases) e  $\beta$ -lactâmicos

### **8.1. Ceftazidima + Avibactam**

Ceftazidima + avibactam foi a primeira formulação antimicrobiana liberada após a aprovação do programa americano GAIN e o FDA revisou e aprovou de forma rápida apenas com dados de ensaio da fase II, não incluindo pacientes infectados com patógenos resistentes aos carbapenêmicos (87).

Ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração que atua ligando-se às PBP<sub>3</sub> e inibe a biosíntese da parede celular, especialmente na PBP<sub>3</sub> das bactérias Gram negativas como *P.aeruginosa*. Avibactan é um inibidor de  $\beta$ -lactamase não  $\beta$ -lactâmico, pertencente à classe dos diazabicyclooctano (DBOs) e capaz de inibir reversivelmente as  $\beta$ -Lactamases contendo serina no sítio ativo, como as de classe A (TEM, SHV, CTX-M, ESBL, KPC), C (AmpC) e algumas da classe D (OXA-48), resgatando assim a ceftazidima. Entretanto, não atua contra as da classe B (MBLs) e OXAs (23, 40, 51 e 58) de *Acinetobacter spp*, como também, a combinação apresenta limitada ação contra anaeróbios. Portanto, a combinação de ceftazidima com avibactam veio para atuar nas bactérias produtoras de carbapenemases KPC, OXA-48 e AmpC. Essa formulação está disponível em frasco de 2,5 g (ceftazidima: 2 g + avibactan: 0,5 g) administrados por infusão intravenosa em 2 horas aprazados q8h por 7 – 14 dias, para pacientes com função renal normal, necessitando ajustar na disfunção renal. Atualmente, esse antimicrobiano está indicado contra infecções complicadas do trato urinário, abdominais e pneumonias hospitalares e as associadas a ventilação mecânica, especialmente causadas por patógenos produtores de carbapenemases não MBL. A ação farmacodinâmica dessa combinação foi avaliada in vivo em infecção de pele e partes moles e pulmão, sendo correlacionada com o índice %fT>MIC (88,89).

Embora esse antimicrobiano seja um grande avanço nos últimos anos para o combate de infecções causadas por patógenos Gram negativos produtores de carbapenemases, seu elevado custo ( $\approx$ R\$ 1.700,00/dia) torna-o limitado para disponibilizá-lo amplamente nos hospitais dos países com baixa renda e em desenvolvimento como o Brasil, em que os recursos financeiros para os sistemas de saúde são escassos.

## 8.2. Ceftolozane + Tazobactam

Ceftolozane é uma nova cefalosporina, considerada de geração avançada, que apresenta ação bactericida pela inibição da síntese da parede celular, mediada principalmente pela ligação nas PBP<sub>1b</sub>, PBP<sub>1c</sub> e PBP<sub>3</sub>, diferenciando-a das outras cefalosporinas. Essa ação diferenciada fornece cobertura estendida contra muitas *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e *P.aeruginosa* MDR (90). Estruturalmente é semelhante a ceftazidima, mas apresenta um pesado anel pirazole que a previne da hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases AmpC produzidas pelas *P.aeruginosa*, como também, possui um anel aminothiazole e um grupo oxime, os quais conferem maior estabilidade à ação das  $\beta$ -lactamases, aumentando assim a ação inibitória contra patógenos Gram negativos MDR. O tazobactam apresenta um anel  $\beta$ -Lactâmico e é um inibidor clássico das  $\beta$ -lactamases, e sua adição a ceftolozane forneceu aumento na atividade contra

*Enterobacteriaceae* produtora de ESBL (incluindo aquelas resistentes a ceftazidima) e *P. aeruginosa* MDR, como também, possibilitou ação contra *Streptococcus* e anaeróbios como *B. fragilis*. Entretanto, não apresenta ação contra patógenos Gram negativos produtores de carbapenemases tipo KPC e MBL, e limitada ação contra *Staphylococcus* spp e *Acinetobacter* spp (91).

Como outros  $\beta$ -lactâmicos, a ação farmacodinâmica da ceftolozane correlaciona-se com o índice %fT>MIC. Esse antimicrobiano está disponível em frascos de 1,5 g (ceftolozane: 1 g; tazobactam: 0,5 g), que deve ser usado na posologia diária de 1,5 g q8h em pacientes com clearance de creatinina >50 mL/min, infundidas em 1 hora, sendo indicado atualmente contra infecções urinárias complicadas e abdominais. Esse antimicrobiano ainda não está aprovado para o tratamento de pneumonias, mas sua potente ação contra patógenos Gram negativos MDR incluindo *P. aeruginosa*, a alta taxa de cura em pacientes com fibrose cística e sua boa penetração no líquido de revestimento epitelial (ELF), demonstram grande potencial para contemplar essa indicação. Estudos de PK/PD sugerem que sua posologia deve ser aumentada para 3 g q8h horas quando utilizado no tratamento de pneumonias. Estudo fase III (ASPECT-NP) utilizando ceftolozane + tazobactam em pacientes com pneumonia hospitalar e associada a ventilação mecânica estão acontecendo, embora outros estudos menores demonstraram sua eficácia contra pneumonias (92, 93).

O elevado custo diário de tratamento (R\$ 891,00; posologia: 1,5 g q8h) também é um limitante para sua disponibilização ampla nos hospitais de países com baixa renda e em desenvolvimento.

### 8.3. Meropenem + Vaborbactam

Meropenem é um agente  $\beta$ -lactâmico carbapenêmico estabelecido na clínica há vários anos, com amplo espectro de ação incluindo patógenos não fermentadores e estável às ESBL. Vaborbactam é um ácido borônico cíclico farmacofórico sem anel  $\beta$ -lactâmico, pertencente à nova geração dos inibidores não suicidas (ligação reversível) das  $\beta$ -lactamases, que apresenta alta afinidade do boronato ao sítio ativo enzimático contendo serina, levando a formação de um complexo covalente e inibição das  $\beta$ -lactamases. Apresenta ação contra as  $\beta$ -lactamases das classes A, C e algumas da classe D. Estudos *in vitro* demonstram que vaborbactam reduziu a MIC<sub>50</sub> do meropenem contra 991 isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC de 32  $\mu$ g/mL para 0,06  $\mu$ g/mL e a MIC<sub>90</sub> de 32  $\mu$ g/mL para 1  $\mu$ g/mL (93). Como vaborbactam havia sido avaliado em estudo clínico com biapenem, seu estudo com meropenem foi iniciado na fase III (TANGO1), e seus resultados sustentaram a recente aprovação do FDA em agosto de 2017

para a indicação contra infecções urinárias. Outros estudos que avaliam essa combinação contra pneumonia hospitalar e bacteremia estão acontecendo, e os resultados preliminares demonstram superioridade sobre os regimes antimicrobianos alternativos. Contra algumas espécies de *K. pneumoniae* produtora de KPC com expressão reduzida dos genes codificadores das porinas OmpK35 e OmpK36, essa combinação apresentou ação diminuída, como também, pequeno efeito contra *A. baumannii* produtor de OXA-carbapenemases (86,93).

#### **8.4. (Imipenem + Cilastatina) + Relabactam**

Imipenem foi o primeiro agente  $\beta$ -lactâmico carbapenêmico descoberto e utilizado na clínica, e sempre acompanhado de cilastatina para inibir a enzima renal dihidropeptidase, capaz de hidrolisá-lo por não conter o grupamento 1- $\beta$ -metil na sua molécula. Como os subsequentes carbapenêmicos desenvolvidos, imipenem apresenta alta potência, amplo espectro de ação e boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases ESBL, promovida pela cadeia lateral trans-1-hydroxiethyl que protege por estereoquímica. Relabactam faz parte também dos novos inibidores não  $\beta$ -lactâmicos reversíveis das  $\beta$ -lactamases de serina, análogo dos DBOs com a inclusão do anel piperidínico, capaz de inibir as  $\beta$ -lactamases classes A e C. Estudos *in vitro* da combinação contra isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC reduziu a MIC em até 64 vezes, e contra *P. aeruginosa* reduziu a MIC de  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  para  $2 \mu\text{g/mL}$ . Entretanto, apresentou pequena ou nenhuma redução nas MICs quando testado contra isolados de *K. pneumoniae* OXA-48 ou *A. baumannii* OXA-23, sugerindo que esse inibidor não é significativamente ativo contra a classe D das  $\beta$ -lactamases, diferente do avibactam. Estudos fase II foram concluídos com essa combinação (imipenem/cilastatina: 500mg + relabactam: 125 mg ou 250 mg) e obtiveram altas taxas de resposta clínica ( $> 95\%$ ). Atualmente acontecem estudos de fase III incluindo pneumonia hospitalar, pneumonia associada a ventilação mecânica, infecção abdominal e infecções complicadas do trato urinário (45,86,91,94).

#### **8.5. Cefiderocol**

Cefiderocol é uma nova cefalosporina siderófora com uma cadeia lateral catecol que liga-se ao íon ferro resultando num complexo, o qual é transportado por processo ativo e difusão passiva para o espaço periplasmático, usando o sistema transportador desse íon com subsequente destruição da parede celular. Estudos *in vitro* mostraram que o cefiderocol é um dos novos antimicrobianos de potencial mais promissor, apresentando potente ação contra várias espécies de patógenos Gram negativos incluindo *Enterobacteriaceae* e BGN-não fermentadores, e também produtores de  $\beta$ -lactamases das classes A, B, C e D. Estudo de fase

III em pacientes com infecção urinária complicada foi recentemente concluído demonstrando sua superioridade com o comparador imipenem + cilastatina. Os resultados prévios de outro estudo fase III de cefiderocol em pacientes com infecções graves (infecção de corrente sanguínea, infecção do trato urinário complicada, pneumonia hospitalar e pneumonia associada a ventilação mecânica) causadas por Gram negativos produtores de carbapenemases, e comparado às melhores terapias disponíveis, demonstram evidente eficácia dessa nova cefalosporina (93,95,96).

### **8.6. Aztreonan + Avibactam**

Aztreonan é um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico monocíclico aprovado pelo FDA desde 1986 para o tratamento de infecções causadas por patógenos Gram negativos. O fato do aztreonam não ser hidrolisado pelas enzimas MBLs tem despertado grande interesse nos clínicos diante da falta de opções terapêuticas contra patógenos produtores dessa enzima. Aztreonam é hidrolisado rapidamente pelas ESBL que são comuns em muitos patógenos, como também pelas enzimas KPCs, quando desprovido do inibidor de  $\beta$ -lactamase. A combinação do aztreonam com avibactam melhora a atividade contra patógenos MDR, fornecendo estabilidade contra as serino-carbapenemase, MBLs e algumas carbapenemases da classe D. In vitro, a combinação aztreonam + avibactam mostra superioridade ao aztreonam sozinho contra espécies de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL, KPC, AmpC e MBLs, entretanto, é menos efetiva contra *P. aeruginosa*, e sem atividade contra *A. baumannii*. Estudos clínicos de fase II em pacientes com infecções abdominais graves estão acontecendo. Vários relatos de casos utilizando aztreonam combinado com ceftazidima + avibactam com posologias empíricas contra infecções causadas por patógenos produtores de MBLs demonstraram sucesso terapêutico, entretanto, faltam estudos randomizados controlados, até mesmo para direcionar a dose e o tempo para administração da combinação dos antimicrobianos (97-100).

- **Antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos.**

### **8.7. Plazomicina**

Plazomicina é um aminoglicosídeo derivado da sisomycin e como outros agentes da classe apresenta atividade bactericida concentração dependente, inibindo a síntese proteica pela ligação na subunidade 30S do ribossomo e causando a morte bacteriana. Plazomicin se destaca dos outros aminoglicosídeos porque além de combater patógenos produtores de ESBL, AmpC e KPC, o mecanismo comum de resistência contra essa classe de antimicrobianos (enzima

modificadora de aminoglicosídeos) não consegue atingi-lo. A posologia de plazomicin está recomendada em 15 mg/kg a cada 24 horas.

Esse aminoglicosídeo é ativo contra *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemase, não fermentadores e *A. baumannii* produtor de OXA, resistentes aos outros aminoglicosídeos. Estudo de fase III que avaliou esse aminoglicosídeo acompanhado de monitoramento sérico, em pacientes com infecção de corrente sanguínea, pneumonia hospitalar e pneumonia associada a ventilação mecânica causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase, combinado com meropenem ou tigeciclina, plazomicina demonstrou menor taxa de mortalidade. Em avaliação contra infecção urinária complicada causada por patógenos produtores de KPC, plazomicina também foi superior ao meropenem. Além disso, esse agente demonstrou boa segurança ao paciente, apresentando baixas taxas de reações adversas, com menor aumento de creatinina sérica quando comparado aos outros aminoglicosídeos, e nenhum caso de ototoxicidade (101, 102).

## 8.8. Eravaciclina

Eravaciclina é uma fluorociclina sintética de estrutura semelhante à tigeciclina com largo espectro de ação contra patógenos Gram positivos, Gram negativos e anaeróbios, incluindo *S. aureus* resistentes a meticilina, *Enterococcus* spp resistente a vancomicina, *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, KPC e OXA, sendo considerado o antimicrobiano mais potente contra *A. baumannii* MDR. Eravaciclina mostrou ser 2 – 4 vezes mais potente que a tigeciclina contra *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos. Entretanto, como outras tetraciclina, não atua contra *P. aeruginosa*. Eravaciclina não está sujeita aos mecanismos de resistência para tetraciclina, como bomba de efluxo e alteração nas proteínas do ribossomo. Outra vantagem importante desse antimicrobiano é ser disponível em formulações intravenosa e oral, possibilitando a alta hospitalar precoce do paciente ainda em tratamento contra infecções por patógenos MDR. Em estudo fase III concluído recentemente em pacientes com infecção intra-abdominal complicada, eravaciclina não foi inferior ao ertapenem como comparador. Ainda não existe avaliação em pacientes com infecção pulmonar, mas os estudos com voluntários saudáveis mostraram que a concentração de eravaciclina no ELF e macrófagos alveolares foi 6 vezes e 50 vezes maior que no plasma, respectivamente, demonstrando seu grande potencial para o tratamento de infecções pulmonares. Além disso, eravaciclina foi bem tolerada pelos pacientes avaliados, não existindo nenhum caso da necessidade de suspender o tratamento por reações adversas (103, 104).

Tabela 2. Atividade dos novos antimicrobianos contra as  $\beta$ -lactamases.

	CTX-M	SHV	TEM	KPC	NDM	VIM	IMP	AmpC	OXA
Ceftazidima + Avibactam	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo
Meropenem + Varbobactam	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho
Imipenem/Cilastatina + Relebactam	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho
Aztreonam + Avibactam	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo
Plazomicin	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho
Eravaciclina	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde	Amarelo
Cefiderocol	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Verde: atividade *in vitro* ou *in vivo* sugere ação contra patógenos produtores dessas  $\beta$ -lactamases, Amarelo: atividade *in vitro* variável; vermelho: não apresenta atividade *in vitro*. Fonte: Plazak et al. (86).

## JUSTIFICATIVA

O grande número de pacientes hospitalizados com graves infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR), produtoras ou não produtoras de MBL e *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC, acarretando altas taxas de morbidade, mortalidade e elevados custos ao sistema de saúde; a condição impotente dos profissionais de saúde frente a escassez de antimicrobianos eficazes para tratar infecções causadas por esses patógenos; a obsolescência dos antimicrobianos pela disseminação crescente da resistência microbiana; o alto custo dos novos antimicrobianos que são capazes de combater esses patógenos, entretanto, inacessíveis a maioria dos centros de saúde no mundo; os antimicrobianos desenvolvidos há décadas que ainda podem ser opções terapêuticas viáveis, exigindo melhores estudos para resgatá-los; os vários estudos recentes que avaliaram tratamentos das infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR produtoras de MBL e *K. pneumoniae* produtora de KPC e mostraram superioridade da terapia combinada sobre a monoterapia, entretanto, não apontaram as posologias adequadas; e a alta complexidade dos estudos clínicos farmacodinâmicos que exigem muitos profissionais de saúde e pacientes, longos períodos, grandes investimentos financeiros, podendo ser substituídos com boa previsibilidade pelas análises de simulação de Monte Carlo.

Diante do exposto, vimos a necessidade de avaliar a ação sinérgica, por índice da fração da concentração inibitória (FICI) e índice de aditividade de Loewe, da fosfomicina com meropenem contra isolados de *P. aeruginosa* MDR produtoras e não produtoras de MBL e meropenem com gentamicina contra isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2, e realizar análises farmacodinâmicas para propor as posologias combinadas mais adequadas.

## OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar a ação sinérgica das combinações antimicrobianas de meropenem com fosfomicina contra isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR produtoras e não produtoras de MBL e meropenem com gentamicina contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, e analisar a farmacodinâmica identificando as posologias combinadas mais adequadas.

### ESPECÍFICOS

Avaliar a ação sinérgica pelo método de FICI das combinações de meropenem com fosfomicina contra isolados de *P. aeruginosa* MDR produtoras e não produtoras de MBL e meropenem com gentamicina contra isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2;

Avaliar a ação sinérgica pelo método de índice de aditividade de Loewe das combinações de meropenem com fosfomicina contra isolados de *P. aeruginosa* MDR produtoras e não produtoras de MBL, e meropenem com gentamicina contra isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2;

Analisar o alcance farmacodinâmico dos regimes em monoterapia e terapia combinada contra isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 e *P. aeruginosa* MDR produtoras e não produtoras de MBL, utilizando o método de simulação de Monte Carlo;

Propor regimes combinados de meropenem com fosfomicina contra 19 isolados clínicos de *P. aeruginosa* (MBL e não MBL) e meropenem com gentamicina contra 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, os quais forneçam o maior alcance farmacodinâmico.

## Referências

1. Anne-Sophie B, Benoit G. Multidrug resistant (or antimicrobial-resistant) pathogens - alternatives to new antibiotics? *Swiss Med Wkly*. 2017;147:1-15.
2. Livermore DM, Warner M, Jamrozny D, Mushtaq S, Nichols WW, Mustafa N, et al. In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in *Enterobacteriaceae* with KPC-3 carbapenemase. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:5324–5330
3. Alm RA, Johnstone MR, Lahiri SD. Characterization of *Escherichia coli* NDM isolates with decreased susceptibility to aztreonam/avibactam: role of a novel insertion in PBP3. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1420–1428.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. [Acessado em 23/01/2019].
5. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. Disponível em: [http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf). [Acessado em 24/01/2019].
6. Tomson G, Vlad I. The need to look at antibiotic resistance from a health systems perspective. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):117-124.
7. Hoffman SJ, Outterson K, Røttingen J, Cars O, Clift C, Rizvi Z, Rotberg F, Tomson G, Zorzet A. An international legal framework to address antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2015;93(2):66.
8. Brown ED. Is the GAIN Act a turning point in new antibiotic discovery? *Can J Microbiol*. 2013;59(3):153-6.
9. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079-1081
10. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016:1-8.
11. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30 (Suppl. 1): 8-12.
12. Lupo A, Haenni M, Madesc J. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectrum*. 2018;6(3):1-16.

13. Li H, Luo Y, Williams BJ, Blackwell TS, Xie C. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(2):63-68.
14. Rybtke M, Hultqvist, LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *Journal of Molecular Biology*. 2015;427:3628–3645.
15. Xian-Zhi Li, Patrick Plésiat, Hiroshi Nikaido. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Microbiol Ver*. 2015;28(2):337-418.
16. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:568–85.
17. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 13(41):252–275.
18. Ju L, Cheng Z, Fast W, Bonomo RA, Crowder MW. The Continuing Challenge of Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters. *Trends Pharmacol Sci*. 2018; 39(7):635-647.
19. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(5):381-393.
20. Bush K. Past and present perspectives on beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(10):1-20.
21. Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Current Infectious Disease Reports*. 2018;20(13):1-12.
22. Karaikos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019;10:1-17.
23. Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4793-4799.
24. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K pneumoniae: a systematic review. *Am J Infect Control*. 2016; 44(11):1374–1380.

25. Somboro AM, Sekyere JO, Amoako DG, Essack SY, Bester LA. Diversity and Proliferation of Metallo- $\beta$ -Lactamases: a Clarion Call for Clinically Effective Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Appl Environ Microbiol.* 2018;31(84):1-44.
26. Walsh, T.R., M.A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. Metallo- $\beta$ -lactamases: The quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18:306–325.
27. McGearry RP, Tan DT, Schenk G. Progress toward inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases. *Future Med Chem.* 2017;9(7):673-691.
28. Hayden MK, Lin MY, Lolans K, Weiner S, Blom D, Moore NM, et al. Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in long-term acute-care hospitals. *Clin Infect Dis.* 2015;60(8):1154–1161.
29. Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother.* 2015;21(5):319-329
30. Sy KB, Zhuang L, Derendorf H. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Antibiotic Dose Optimization. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016;12(1):93-114.
31. Gillespie EL, Kuti JL, Nicolau DP. When "S" does not mean success: the importance of choice of antibiotic and dose on clinical and economic outcomes of severe infection. *Conn Med.* 2005;69(4):203-210.
32. Kanazawa N, et al. An initial dosing method for teicoplanin based on the area under the serum concentration time curve required for MRSA eradication. *J Infect Chemother.* 2011; 17:297–300.
33. Bonate PL. A brief introduction to Monte Carlo simulation. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(1):15-22.
34. Kuti JL, Dandekar PK, Nightingale CH, Nicolau DP. Use of Monte Carlo simulation to design an optimized pharmacodynamic dosing strategy for meropenem. *J Clin Pharmacol.* 2003; 43(10):1116-1123.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pensilvany, USA, 2019.
36. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>. [acessado 07/04/2019]

37. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):37-45.
38. Abdelraouf K, Linder KE, Nailor DM, Nicolau DP. Predicting and preventing antimicrobial resistance utilizing pharmacodynamics: part II Gram-negative bacteria. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2017;13(7):705-714.
39. Albiero J, Sy SK, Mazucheli J, Caparroz-Assef SM, Costa BB, Alves JL, et al. Pharmacodynamic Evaluation of the Potential Clinical Utility of Fosfomycin and Meropenem in Combination Therapy against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4128-139.
40. Tang J, Wennerberg K, Aittokallio T. 2015. What is synergy? The Saariselka agreement revisited. *Front Pharmacol.* 2015; 6(181):1-5.
41. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Ver.* 2012;25:450-470.
42. Pillai SK, Moellering R, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. 5th ed. Philadelphia, PA, EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
43. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Ver.* 1995;47:331-385.
44. Tam VH, Schilling AN, Lewis RE, Melnick DA, Boucher NA. Novel Approach to Characterization of Combined Pharmacodynamic Effects of Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004; 48(11):4315–4321.
45. El-Gamal MI, Imen Brahim, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017; 131:185-195.
46. Bulik CC, Nicolau DP. In vivo efficacy of simulated human dosing regimens of prolonged-infusion Doripenem against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4112-4115.
47. Tumbarello M, Trecarichi EM, Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(7):2133-2143.
48. Bartoletti M, Giannella M, Lewis RE, Caraceni P, Tedeschi I, Paul M. Extended infusion of  $\beta$ -lactams for bloodstream infection in patients with liver cirrhosis: an observational multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2019; 14. Epub ahead of print.

49. Bulik CC, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3002–3004.
50. De Pascale G, Martucci G, Montini L, Panarello G, Cutuli SL, Di Carlo D. Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case–control study. *Crit Care*. 2017; 21(1):1-10.
51. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:102–111.
52. Bergen PJ, Bulman ZP, Landersdorfer CB, Smith N, Lenhard JR, Bulitta JB, et al. Optimizing Polymyxin Combinations Against Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther*. 2015; 4:391–415.
53. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2780–2784.
54. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(4):391-400.
55. Nation RL, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarello-Bourboulis EJ, Forrest A, Paterson DL, et al. Dosing guidance for intravenous colistin in critically ill patients. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(5):565–571.
56. Neuner EA, Gallagher JC. Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in the treatment of critically ill patients infected with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017; 8(4): 440–452.
57. Cai Y, Lee W, Kwa AL. Polymyxin B versus colistin: an update. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015;13(12):1-19.
58. Sabuda DM, Laupland K, Pitout J, et al. Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008;19:413–418
59. Souli M, Kontopidou FV, Papadomichelakis E, Galani I, Armaganidis A, Giamarellou H. Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a Greek University Hospital. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 847–854.

60. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;34:506–515.
61. Parker S, Lipman J, Koulenti D, Dimopoulos G, Roberts JA. What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42:289–293.
62. Lepe JA, Torres MJ, Smani Y, Parra-Millan R, Pachon J, Vazquez-Barba I, et al. In vitro and intracellular activities of fosfomycin against clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43:135–139.
63. Lepak AJ, Zhao M, VanScoy B, Taylor DS, Ellis-Grosse E, Ambrose PG, et al. In vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) in the Neutropenic Murine Thigh Infection Model against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(6):1-11.
64. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, et al. Pharmacodynamics of fosfomycin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(9):5602-5610.
65. Walsh CC, McIntosh MP, Peleg AY, Kirkpatrick CM, Bergen PJ. In vitro pharmacodynamics of fosfomycin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:3042–3050.
66. Diep JK, Sharma R, Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of Activity and Emergence of Resistance of Polymyxin B and ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 25(62): e01815-17
67. Bulman ZP, Zhao M, Satlin MJ, Chen L, Kreiswirth BN, Walsh TJ, et al. Polymyxin B and fosfomycin thwart KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the hollow-fibre infection model. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52(1):114-118.
68. Zhao M, Bulman ZP, Lenhard JR, Satlin MJ, Kreiswirth BN, Walsh TJ, et al. Pharmacodynamics of colistin and fosfomycin: a 'treasure trove' combination combats KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):1985-1990.
69. Rodríguez C, Brengi S, Cáceres MA, Mochi S, Viñas MR, Rizza CA, et al. Successful management with fosfomycin/ceftazidime of an infection caused by multiple highly related subtypes of MDR and XDR KPC-producing *Serratia marcescens*. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(5):737-739.

70. Machuca I, Gutiérrez-Gutiérrez B, Gracia-Ahufinger I, Rivera Espinar F, Cano Á, Guzmán-Puche J, et al. Mortality Associated with Bacteremia Due to Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with High-Level Meropenem Resistance: Importance of Combination Therapy without Colistin and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;2561(8):406-417.
71. Guerin F, Henegar C, Spiridon G, Launay O, Salmon-Ceron D, Poyart C. Bacterial prostatitis due to *Pseudomonas aeruginosa* harbouring the blaVIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene from Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:601–2.
72. Seija V, Medina PJC, Bado I, Papa ER, Batista N, Gutierrez C, et al. Sepsis caused by New Delhi metallo-beta-lactamase (*bla*NDM-1) and *qnrD*-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomycin and meropenem: case report and literature review. *Int J Infect Dis*. 2015; 30:20-6.
73. Rosa R, Rudin SD, Rojas LJ, Hujer AM, Perez-Cardona A, Perez F, et al. "Double carbapenem" and oral fosfomycin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by *bla*NDM -harboring *Enterobacteriaceae* in kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2018; 20(1):1-7.
74. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(6):519-526.
75. Germovsek E, Barker CI, Sharland M. What do I need to know about aminoglycoside antibiotics? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2017;102(2):89-93.
76. Winter ME. *Basic Clinical Pharmacokinetics*. 5th edition. Philadelphia, PA, EUA: Lippincot Willians & Wilkins; 2010.
77. Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis*. 1987; 155:93-9.
78. BrCast. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2019.
79. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20:862-72.
80. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS, Cohen AB, Furuya EY, Wilson SJ, et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(12):5893-9.

81. Le J, Ashley ED, Neuhauser MM, Brown J, Gentry C, Klepser ME, et al. Consensus summary of aerosolized antimicrobial agents: application of guideline criteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 2010;30:562-84.
82. Tumbarello M, Losito AR, Giamarellou H. Optimizing therapy in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(6):566-577.
83. Bhavnani SM, Rubino CM, Hammel JP, Forrest A, Dartois N, Cooper CA, et al. Pharmacological and patient-specific response determinants in patients with hospital-acquired pneumonia treated with tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1065-72.
84. TYGACIL™ (tigecycline) [bula]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/021821s026s031lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021821s026s031lbl.pdf). (acessado em 08/04/2019).
85. Bush K, Page MGP. What we may expect from novel antibacterial agents in the pipeline with respect to resistance and pharmacodynamic principles. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2017; 44(2):113-132.
86. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clinical Microbiology and Infection.* 2017;23:704-12.
87. Michael E. Plazak, Pranita D. Tamma & Emily L. Heil. The Antibiotic Arms Race: Current and Emerging Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) - Producing Bacteria. *Expert Opin on Pharmacoth.* 2018;22:1-13.
88. Berkhout J, Melchers MJ, Van Mil AC, Seyedmousavi S, Lagarde CM, Schuck VJ, et al. Pharmacodynamics of Ceftazidime and Avibactam in Neutropenic Mice with Thigh or Lung Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60(1):368-75.
89. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime-avibactam: a systematic review. *Infection.* 2018;46(2):165-181.
90. Tato M, García-Castillo M, Bofarull AM, Cantón R; CENIT Study Group. In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* recovered in Spanish medical centres: Results of the CENIT study. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(5):502-10.
91. Ling-Shan S, Yen-Hsu C, Wen-Chien K, Po-Ren H. New drugs for the treatment of complicated intra-abdominal infections in the era of increasing antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 47(4):250-8.

92. ZERBAXA™ (ceftolozane/tazobactam). [bula]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/206829lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/206829lbl.pdf). (Acessado em 08/04/2019)
93. Bassetti M, Righi E, Russo A, Carnelutti A. New Antibiotics for Pneumonia. *Clin Chest Med*. 2018;39:853–869.
94. Hirsch EB, Ledesma KP, Chang KT, Schwartz MS, Motyl MR, Tam VH. In vitro activity of MK-7655, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:3753–3757.
95. Mollmann U, Heinisch L, Bauernfeind A, Kohler T, Ankel-Fuchs D. Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. *Biometals*. 2009; 22:615-624.
96. Portsmouth S, Veenhuyzen D, Echols R, Machida M, Ferreira JCA, Ariyasu M, et al. Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(12):1319-1328.
97. Hobson CA, Bonacorsi S, Fahd M, Baruchel A, Cointe A, Poey N, et al. Successful Treatment of Bacteremia Due to NDM-1-Producing *Morganella morganii* with Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination in a Pediatric Patient with Hematologic Malignancy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;29;63(2). pii: e02463-18
98. Avery LM, Nicolau D. Assessing the in vitro activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Defining the zone of hope. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(5):688-691.
99. Chew KL, Tay MKL, Cheng B, Lin RTP, Octavia S, Teo JWP. Aztreonam-Avibactam Combination Restores Susceptibility of Aztreonam in Dual-Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 27(62):
100. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 14(31). pii: e00079-17.
101. Trang M, Seroogy JD, Van-Wart SA, Bhavnani SM, Kim A, Gibbons JA, et al. Population Pharmacokinetic Analyses for Plazomicin Using Pooled Data from Phase 1, 2, and 3 Clinical Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(4). pii: e02329-18.
102. Shaer KM, Zmarlicka MT, Chahine EB, Piccicacco N, Cho JC. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. *Pharmacotherapy*. 2019;39(1):77-93.

103. Zhanel GG, Cheung D, Adam H, Zelenitsky S, Golden A, Schweizer F, et al. Review of Eravacycline, a Novel Fluorocycline Antibacterial Agent. *Drugs*. 2016;76(5):567-88.
104. Solomkin J, Evans D, Slepavicius A, Lee P, Marsh A, Tsai L, et al. Assessing the Efficacy and Safety of Eravacycline vs Ertapenem in Complicated Intra-abdominal Infections in the Investigating Gram-Negative Infections Treated With Eravacycline (IGNITE 1) Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg*. 2017;152(3):224-232.
105. Seifert H, Stefanik D, Sutcliffe JA, Higgins PG. In-vitro activity of the novel fluorocycline eravacycline against carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(1):62-64.

## CAPÍTULO II

**Artigo:** Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase.

Original Article accept by **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**

### ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2019

Accepted 11 March 2019

zac-aac/zac00619/zac8061d19z	xppws	S=5	4/1/19	5:22	ArtID: 00126-19	DOI:10.1128/AAC.00126-19	CE: MKH
------------------------------	-------	-----	--------	------	-----------------	--------------------------	---------

Editor: James E. Leggett	Section: Clinical Therapeutics	Designation: T
-----------------------------	-----------------------------------	-------------------



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy®

CLINICAL THERAPEUTICS



## Pharmacodynamic Attainment of the Synergism of Meropenem and Fosfomycin Combination against *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- $\beta$ -Lactamase

James Albiero,<sup>a</sup> Josmar Mazucheli,<sup>b</sup> Juliana Pimenta dos Reis Barros,<sup>a</sup> Marcia Maria dos Anjos Szczerepa,<sup>a</sup> Sheila Alexandra Belini Nishiyama,<sup>a</sup> Floristher Elaine Carrara Marroni,<sup>c</sup> Serubbabel Sy,<sup>d</sup> Matthew Fidler,<sup>e</sup> Sherwin K. B. Sy,<sup>b</sup> Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioestatística, Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

<sup>d</sup>Department of Chemical Engineering, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada

<sup>e</sup>Novartis Pharmaceuticals Corporation, Fort Worth, Texas, USA

**Citation** Albiero J, Mazucheli J, Barros JPDR, Szczerepa MMDA, Nishiyama SAB, Carrara Marroni FE, Sy S, Fidler M, Sy SKB, Tognim MCB. 2019. Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00126-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-19>.

**Copyright** © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Maria Cristina Bronharo Tognim, [mcbtognim@uem.br](mailto:mcbtognim@uem.br).

**Received** 19 January 2019

**Returned for modification** 21 February 2019

**Accepted** 11 March 2019

**Accepted manuscript posted online** 25 March 2019

**Published**

**Title:** Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase.

James Albiero<sup>1</sup>, Josmar Mazucheli<sup>2</sup>, Juliana Pimenta dos Reis Barros<sup>1</sup>, Marcia Maria dos Anjos Szczerepa<sup>1</sup>, Sheila Alexandra Belini Nishiyama<sup>1</sup>, Floristher Elaine Carrara Marroni<sup>3</sup>, Serubbabel Sy<sup>4</sup>, Matthew Fidler<sup>5</sup>, Sherwin K. B. Sy<sup>2</sup>, Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioestatística, Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil; <sup>4</sup>Department of Chemical Engineering, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada; <sup>5</sup>Novartis Pharmaceuticals Corporation, Fort Worth, Texas, USA.

**Running Title:** Meropenem-fosfomycin against M $\beta$ L-*P. aeruginosa*

\***Corresponding author:** E-mail: [mcbtognim@uem.br](mailto:mcbtognim@uem.br); Phone: 55-44-3011-4952; Fax: 55-44-3011-4860; Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

## Abstract

**Objectives:** Fosfomycin combined with other antimicrobials showed good efficacy against multidrug-resistant (MDR) bacteria in both *in vitro* and clinical studies; however, fosfomycin combination has not been tested against metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa*. The objective is to determine synergism and optimal intravenous dosing regimens of fosfomycin with meropenem against MDR and MBL-producing *P. aeruginosa*.

**Methods:** MICs of both antimicrobials were determined by checkerboard and analyzed by two synergism tests in 19 clones of *P. aeruginosa* isolates, of which ten were MBL-producers. A pharmacodynamic (PD) analysis was performed for meropenem (1g q8h, 1.5g q6h, 2g q8h) and fosfomycin (4g q8h, 4g q6h, 6g q8h, 8g q8h) regimens with dose reduction in renal impairment by determining the probability of target attainment for target PD indices of meropenem ( $\%fT>MIC: \geq 40\%$ ) and fosfomycin ( $fAUC_{24h}/MIC: \geq 40.8$ ).

**Results:** The combination reduced MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> by 8-fold. Seven (44%) isolates with MICs value in intermediate or resistant ranges became sensitive to meropenem. Of the MBL-producing isolates, the combination resulted in 40% isolates becoming sensitive to meropenem. Meropenem regimens reached PTA  $\geq 90\%$  (MIC= 4 $\mu$ g/mL) in 6 (32%) isolates as monotherapy, and 13 (68%) isolates when combined with fosfomycin. All monotherapy fosfomycin regimens did not reach PTA  $\geq 90\%$  (MIC= 16 $\mu$ g/mL). When combined with meropenem, fosfomycin regimens reached PTA  $\geq 90\%$  in 14 (74%) isolates.

**Conclusions:** The increase in pharmacodynamic activities resulting from the synergistic action of meropenem with fosfomycin demonstrates the potential

relevance of this combination to fight infections caused by MDR and MBL-producing *P. aeruginosa*.

## Introduction

Being an opportunistic, non-fermenting Gram negative bacillus, *P. aeruginosa* is a common cause of nosocomial infections in mainly immunocompromised patients at various sites of infection including pneumonia, abscess, meningitis, urinary tract infections, and catheter-associated infections (1). The adaptive capacity of this pathogen to survive in a low nutrient medium, the presence of several mechanisms of resistance to many antimicrobials including intrinsic, acquired or adaptive resistance, virulence factors and their capacity to form biofilm, favor their survival in various media and contribute to high pathogenicity and high mortality rates in the infected patients (2, 3).

Among the various types of resistance produced by *P. aeruginosa*, the enzymatic mechanism by metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) is the most challenging one because MBLs are capable of hydrolyzing carbapenems and yet there is no clinically effective antimicrobial to combat MBL-producing pathogens. The MBLs belong to class B  $\beta$ -lactamase, which confers drug resistance to the majority of  $\beta$ -lactam antimicrobials (except aztreonam) by hydrolysis through the divalent metals. Characteristics like carbapenem degradation,  $\beta$ -lactamase inhibitor resistance, high capacity gene transfer through plasmids and transposons, and most importantly the lack of effective therapeutic options make the pathogen carrying MBLs a tremendous challenge to treat (4, 5).

Combination therapy provides an alternative to the reduced arsenals of effective monotherapy antimicrobials (6). Some studies have shown that the combination of two or more types of antimicrobial drugs results in a synergistic effect, reducing the risk of inappropriate empirical therapy and resistance development.

Currently, combination therapy is recommended primarily against carbapenemase-producing bacteria, including non-fermenting microorganisms such as *P. aeruginosa* (7-10). However, the literature is still lacking on the choice of effective antimicrobial combinations against MBL-producing *P. aeruginosa*. Among several potential combinations, meropenem with fosfomycin can achieve good microbiological results (10, 11). There are clinical studies that utilized antimicrobial combinations with fosfomycin against MDR *P. aeruginosa* and demonstrated a 90% therapeutic success (12).

Meropenem binds to penicillin binding proteins in the periplasmic space, preventing peptidoglycan biosynthesis and viable cell wall production (13). Fosfomycin binds to the enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, preventing the production of peptidoglycan and inhibiting cell wall biosynthesis (14, 15). The inhibition of peptidoglycan production by meropenem and fosfomycin at different stages of its biosynthesis and the rupture of the outer membrane can theoretically result in synergism of activities between these two antimicrobials. Faced with the scarcity of effective antimicrobials against MBL-producing microorganisms, the aim of this study is to evaluate the pharmacodynamic attainment by Monte Carlo simulation of combined fosfomycin and meropenem intravenous dosing regimens against non-MBL- and MBL-producing *P. aeruginosa* clinical isolates.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Microbiological organisms***

A total of 547 isolates of *P. aeruginosa* were consecutively recovered for two years from different patients from two teaching hospitals (HU/AHC complex, affiliates of the State University of Londrina, Parana, Brazil), which have a total of 540 beds

and constitute a medical reference center that provides health care services to a metropolitan region of more than 1 million in population. Nineteen of these clinical isolates were included in the study based on the following criteria: presence or absence of the different MBL's enzymes, different molecular typing, and different meropenem MICs (from sensitive to highly resistant), thus selecting isolates with large variability. The selection process of the eighteen isolates, starting from the total of the 547 initial isolates, identified by the MicroScan WalkAway automated system (Dade Behring Inc, West Sacramento, CA, USA), started from 141 isolates resistant to ceftazidime and sensitive or non-sensitive to carbapenems (meropenem or imipenem), of which 45 isolates expressed MBL enzymes by phenotypic tests (double-disk synergy test; Etest MBL), as confirmed by PCR-Multiplex [*bla*<sub>SPM-1</sub> (43 isolates); *bla*<sub>IMP-16</sub> (2 isolates)] (16-18). These MBLs positive isolates were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) which demonstrated the presence of nine different clones. In order to increase diversity among the analyzed samples, one isolate from each clone was selected, *bla*<sub>SPM-1</sub> (7 isolates) and *bla*<sub>IMP-16</sub> (2 isolates) (19). The 96 non-MBL isolates were analyzed by the enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) method and subsequently evaluated by BioNumerics version 7.6.1; nine different clones with different MICs for meropenem (from sensitive to resistant) were selected from this group (20). One strain of *P. aeruginosa* encoding the gene *bla*<sub>GIM-1</sub> (isolate 73-5671) was also included (21). In view of the large number of non-MBL isolates (96 isolates), the ERIC-PCR method was chosen to analyze them, since it presents a low cost, shorter analysis time and comparable efficiency as the PFGE method.

### ***Evaluation of combined antimicrobial activity.***

Meropenem (AstraZeneca, Cotia, São Paulo, Brazil) was donated by the State University of Maringa Hospital. Fosfomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was purchased from Lab Company (Londrina, Paraná, Brazil). Fosfomycin was dissolved in water at 10 mg/mL and stored at 20°C, and meropenem solutions were prepared at the same concentration on the day of experimentation.

The antimicrobial activity of the combination of meropenem and fosfomycin against each isolate was evaluated by checkerboard method. Each *P. aeruginosa* isolate was analyzed in triplicate using 96-well microdilution sterile plate containing MHB-CA, at several concentrations of meropenem and fosfomycin, alone or combined. Each well was dispensed a standard 0.5 McFarland inoculum which gave a final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/ml, and incubated at 37°C for 24 hours. The MICs of the antimicrobials alone or in combination were determined for each isolate. The interpretation of the sensitivity, the MIC results of meropenem were performed using the breakpoint values for *P. aeruginosa* according to the CLSI (susceptible:  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ; intermediate: 4  $\mu\text{g/mL}$ ; resistant:  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ). For quality control test, the strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) was used. The concentration ranges of meropenem and fosfomycin tested were 0.015 to 2,048 and 0.5 to 2,048  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

The fraction inhibition concentration index (FICI), based on the checkerboard results, was used to classify combination antimicrobial efficacy:

$$FICI = \frac{MIC(\text{meropenem combination})}{MIC(\text{meropenem})} + \frac{MIC(\text{fosfomycin combination})}{MIC(\text{fosfomycin})}$$

The classification of the combination antimicrobial effect by FICI is as follows:  $FICI \leq 0.5$ , synergistic;  $0.5 < FICI \leq 4$ , indifferent; and  $FICI > 4$ , antagonistic (22). The

MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of the antimicrobials as monotherapy or in combination were the MICs required to inhibit 50% and 90% of the 19 isolates, respectively.

The results of the checkerboard were used in the analysis of synergism of two antimicrobials by Loewe additivity method, using the following equation:

$$1 = \left( \frac{MIC \text{ (meropenem combinado)}}{MIC \text{ meropenem puro}} + \frac{MIC \text{ (meropenem combinado)}}{MIC \text{ gentamicina pura}} \right) + \alpha$$

The classification of the effects of the antimicrobial combination is based on the value of the Loewe additivity index, represented by  $\alpha$  in the equation. If the value of  $\alpha$  is 0,  $> 0$  or  $< 0$ , the antimicrobial combination is classified as additive, synergistic or antagonistic, respectively (23).

### ***Pharmacodynamics of meropenem and fosfomicin antimicrobial activities***

PK/PD studies have shown that the antimicrobial activities of meropenem and fosfomicin are best characterized by the following pharmacodynamic indices: percentage of time in a 24-h duration at which the free drug concentration remains above the MIC ( $\% fT > MIC$ ); and the ratio of the area under the free drug-concentration vs. time curve over 24 hours and MIC ( $fAUC_{24h}/MIC$ ), respectively. Their target values were  $\% fT > MIC \geq 40\%$  for meropenem and  $fAUC_{24h}/MIC \geq 40.8$  for fosfomicin (24, 25).

The pharmacodynamic analysis of meropenem and fosfomicin regimens and respective ranges of renal function, are described as follows: meropenem (1g q8h, 1.5g q6h, 2g q8h for creatinine clearance [ $CL_{cr}$ ]  $> 50$  mL/min; 1g q12h, 1g q6h, 2g q12h for  $CL_{cr} > 25 - 50$  mL/min; 500mg q12h, 500mg q6h, 1g q12h for  $CL_{cr} 10 - 25$  mL/min; 500mg q24h, 500mg q12h, 1g q24h for  $CL_{cr} < 10$  mL/min) regimens for two

infusion durations (0.5 h or 3 h), and fosfomycin (4g q6h, 4g q8h, 8g q8h for  $CL_{cr} >40$  mL/min; 30% dose reduction for  $CL_{cr} 20 - 40$  mL/min, 50% dose reduction for  $CL_{cr} 10 - 20$  mL/min; 70% dose reduction for  $CL_{cr} <10$  mL/min) (26) as 0.5 h infusion were performed for monotherapy or combined therapy, against  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  of the isolates. For meropenem, which is a time-dependent antimicrobial, the goal is to find a regimen that maintains drug concentration for a longer period of time above MIC when administered in fractional doses and by extended infusion, thus providing better therapeutic results. Therefore, the more frequent meropenem dosing regimens of q6h and prolonged infusion duration of 3 hours were included in the analysis (27, 28). For fosfomycin, whose pharmacodynamic index is characterized by AUC/MIC and is not affected by the duration of infusion, a 0.5 hour infusion time was used for all dosing regimens, as recommended by the manufacturer.

### ***Pharmacokinetic model and exposure of meropenem and fosfomycin***

The height and body weight relationship for a 50/50 ratio of adult male to female virtual population consisting of approximately 10,000 individuals per renal function category were simulated as described previously (29-31).  $CL_{cr}$  was simulated assuming uniform distribution (for meropenem:  $>50$  mL/min,  $>25 - 50$  mL/min,  $10 - 25$  mL/min,  $<10$  mL/min; for fosfomycin:  $>40$  mL/min,  $20 - 40$  mL/min,  $10 - <20$  mL/min,  $<10$  mL/min) (32). The corresponding serum creatinine was subsequently back-calculated from the Cockcroft-Gault equation from creatinine clearance values (33).

The population pharmacokinetic model for meropenem was a one-compartment model by Muro et al. (34), which was previously shown to best predict free meropenem drug concentrations in critically ill patients (35). The relationship between serum creatinine (SCr) and meropenem clearance is such that:  $CL(L/h) =$

$11.1 \times \left[ \frac{SCr}{0.7} \right]^{-1}$  with a 52.1% coefficient of variation (CV%). The average volume of distribution was 33.6 L. Protein binding for meropenem was 2%.

The population pharmacokinetic model for fosfomycin was a two-compartment model parameterized on CL,  $V_C$ , volume of peripheral compartment ( $V_P$ ) and intercompartmental clearance (Q). The population pharmacokinetic model of fosfomycin in critically ill patients from Parker et al. (36) was used to simulate virtual patient profiles. Their model reported seven inter-occasion CL parameters. For the purpose of simulation, the highest CL value was used in order to avoid predicting high fosfomycin concentration. Both  $CL_{cr}$  and body weight were influential covariates. The equations for the population CL and  $V_C$  incorporated these two covariates:  $CL (L/h) = 5.57 \times (CL_{cr}/90)$  and  $V_C(L) = 26.5 \times (WT/70)^{0.75}$ .  $V_P$  and Q were 22.3 L and 19.8 L/h, respectively. Interindividual variability was incorporated to CL and  $V_C$ , assuming log-normal distribution of both parameters with CV of 91.9% and 39%, respectively. Fosfomycin has negligible plasma protein binding (37, 38).

For meropenem, the percentage of the 10,000 virtual concentration-time profiles that achieve 40%  $fT > MIC$  over 24-h duration was determined for the three meropenem dosing regimens for infusion durations of 0.5 h or 3 h in the computation of probability of target attainment (PTA). For fosfomycin, PTA was computed in 10,000 area under the concentration-time curve (AUC) computed from the simulated profiles for each dosing regimen and evaluated by the percentage of virtual profiles that reached  $fAUC/MIC \geq 40.8$ . Cumulative fraction of response (CFR) was defined as the sum of the frequency of isolates at each MIC multiplied by the PTA.

The simulation of population pharmacokinetic models was carried out using RxODE package (39). AUC was computed using the trapz function in caTools

package (40). Computations of PTA and CFR were performed with user-defined codes. All simulations, integrations and probability computations were carried out in R 3.5.0 (41).

## RESULTS

### *In vitro susceptibility and synergistic test*

The collection consisted of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates from different clones identified by PFGE or ERIC-PCR, of which 10 were MBL producers [9 isolates this study and 1 isolate from another study (21)], characterized by multiplex PCR.

Table 1 presents the sensitivity profile of the isolates to meropenem and fosfomycin in monotherapy or combination therapy, as well as the results of the synergism tests. The isolates showed a range of meropenem and fosfomycin MIC values from 0.25 to 1024 µg/mL and 32 to 512 µg/mL, respectively. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 16 and 512 µg/mL for meropenem; and 128 and 512 µg/mL for fosfomycin, respectively.

Only three (16%) isolates (PA-114; PA-64; PA-69) were sensitive to meropenem in monotherapies; of the MBL isolates, none were sensitive to meropenem according to the CLSI breakpoints. Combination antimicrobials significantly reduced MICs values of 18 (95%) isolates, up to 1/32 and 1/512 of the monotherapy MIC for meropenem and fosfomycin, respectively, as well as reducing MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> to 1/8. The reduction in MIC values resulting from the combination of antimicrobials was quite pronounced that it shifted isolates previously classified as resistant and intermediate in monotherapy to within the sensitive range. Of the 16 isolates with MIC values greater than the susceptible breakpoints for meropenem, 7 (44%) isolates presented MIC values less than or equal to susceptible breakpoint

values, when the two antimicrobials were combined. The MBL-producing isolates showed a greater reduction of MIC values with the two-agent combination, when compared to the non-MBLs isolates, resulting in MIC values of up to 32- and 512-fold reduction for meropenem and fosfomycin against the MBL isolates, respectively. However, among the non-MBL isolates, the maximum MIC decrease was only 16-fold for both antimicrobials.

The synergistic action of the combination of meropenem and fosfomycin was exhibited against the majority of the MBL and non-MBL producers, as evaluated by two criteria for synergism. Of the 19 isolates, the FICI analysis showed synergism in 15 (79%), indifferent in 4 (21%), and no antagonism; while Loewe Additivity Index criteria resulted in synergism for 18 (95%) isolates and only one isolate presented antagonism.

### ***Pharmacokinetics-pharmacodynamic simulation***

Figure 1 shows the PTA ( $fAUC/MIC \geq 40.8$ ) achieved by the 4 different fosfomycin intravenous regimens (4g q8h, 4g q6h, 6g q8h, 8g q8h) and the reduced doses in percentages (30%, 50%, 70%) according to stages of renal impairment based on the  $CL_{cr}$  ranges (20 - 40 mL/min; 10 - <20 mL/min and <10 mL/min), respectively, against MIC values and the respective frequencies of the isolates, in both monotherapy and combination therapy.

For patients with  $Cl_{cr} > 40$  mL/min, all fosfomycin regimens reached PTA  $\geq 90\%$  at least for MIC of 16  $\mu\text{g/mL}$ , and the two biggest fosfomycin monotherapy dosing regimens achieved PTA  $\geq 90\%$  for MIC of 32  $\mu\text{g/mL}$ . The synergistic action of the combined fosfomycin and meropenem regimens was evident. Fosfomycin regimens (6 g q8h, 8 g q8h) in monotherapy achieved PTA  $\geq 90\%$  at MIC of 32

$\mu\text{g/mL}$  against only two (11%) isolates; however when combined with meropenem, the same regimens achieved  $\text{PTA} \geq 90\%$  at MIC of  $32 \mu\text{g/L}$  against 17 (89%) isolates. Reductions in fosfomicin doses in patients with renal impairment ( $\text{CL}_{\text{cr}} \leq 40 \text{ mL/min}$ ) did not reduce the MIC values to reach  $\text{PTAs} \geq 90\%$ ; rather higher MIC breakpoints were achieved. As an example, the fosfomicin regimen of  $8 \text{ g q8h}$  for  $\text{CL}_{\text{cr}} > 40 \text{ mL/min}$  reached  $\text{PTA} > 90\%$  for MIC of  $32 \mu\text{g/mL}$ ; when the dosing regimen was reduced by 30% and 50% for  $\text{CL}_{\text{cr}}$  ranges ( $20 - 40 \text{ mL/min}$ ,  $10 - < 20 \text{ mL/min}$ ), respectively,  $\text{PTA} \geq 90\%$  was achieved for MIC of  $64 \mu\text{g/mL}$ .

Figure 2 shows the PTA achieved by fosfomicin in a worst-case scenario ( $f\text{AUC}/\text{MIC} \geq 193$ ) for the same fosfomicin regimens and reduced daily doses in the respective  $\text{CL}_{\text{cr}}$  category in both monotherapy and combination settings as that in Figure 1. Considering that the evaluated target was almost 5 times higher than the original target ( $f\text{AUC}/\text{MIC} \geq 40.8$ ), the PTA achieved in this scenario were much lower, as expected. For patients with  $\text{CL}_{\text{cr}} > 40 \text{ mL/min}$ , fosfomicin regimens reached  $\text{PTA} \geq 90\%$  only at a MIC value of  $4 \mu\text{g/mL}$ , and only the higher regimen (fosfomicin  $8 \text{ g q8h}$ ) achieved  $\text{PTA} \geq 90\%$  for MIC of  $8 \mu\text{g/mL}$ . Coverage of monotherapy or combination therapy regimens against the amount of isolates was also significantly reduced, including the other adjusted doses for lower  $\text{CL}_{\text{cr}}$  ranges.

Figure 3 shows the PTA achieved by the different meropenem regimens used for the respective  $\text{CL}_{\text{cr}}$  ranges:  $1 \text{ g q8h}$ ,  $1.5 \text{ g q6h}$ ,  $2 \text{ g q8h}$  for  $\text{CL}_{\text{cr}} > 50 \text{ mL/min}$ ;  $1 \text{ g q12h}$ ,  $1 \text{ g q6h}$ ,  $2 \text{ g q12h}$  for  $\text{CL}_{\text{cr}} > 25 - 50 \text{ mL/min}$ ;  $0.5 \text{ g q12h}$ ,  $0.5 \text{ g q6h}$ ,  $1 \text{ g q12h}$  for  $\text{CL}_{\text{cr}} 10 - 25 \text{ mL/min}$ ,  $0.5 \text{ g q24h}$ ,  $0.5 \text{ g q12h}$ ,  $1 \text{ g q24h}$  for  $\text{CL}_{\text{cr}} < 10 \text{ mL}$ , infused over  $0.5 \text{ h}$  or  $3 \text{ h}$  against incremental MIC values and the respective frequency of the isolates, in both monotherapy or combination therapy.

In patients with  $CL_{cr} > 50$  mL/min wherein dose reduction was not required, all evaluated regimens achieved  $PTA \geq 90\%$  for MIC of 4  $\mu\text{g/mL}$ , which is considered an intermediate breakpoint according to the CLSI criteria. The two highest regimens administered as 0.5 h or 3 h infusion achieved  $PTA \geq 90\%$  for MIC of 8  $\mu\text{g/mL}$  (resistant breakpoint according to CLSI), and the meropenem regimen 1.5 g q6h given as 3 h infusion achieved  $PTA \geq 90\%$  for MIC of 16  $\mu\text{g/mL}$ , which is considered a high MIC value. The synergism of combination meropenem regimens was also evidenced in these pharmacodynamic analyses. All meropenem monotherapy regimens achieved  $PTA \geq 90\%$  against only 6 (32%) isolates at MIC of 4  $\mu\text{g/mL}$ ; however when combined with fosfomycin, these regimens reached  $PTA \geq 90\%$  for the same MIC value against 13 (68%) isolates. The meropenem dose regimens (1.5 q6h; 2 g q8h) in monotherapy achieved  $PTA \geq 90\%$  up to MIC of 8  $\mu\text{g/mL}$  covering 9 (47%) isolates; however when combined, they achieved  $PTA \geq 90\%$  at the same MIC value against 14 (74%) isolates.

The reduction in the daily dose of meropenem in patients with  $CL_{cr} \leq 50$  mL/min did not result in a decrease in the pharmacodynamic coverage; instead there was even some improvement. Of the meropenem regimens infused in 0.5h evaluated in patients with  $CL_{cr} > 50$  mL/min,  $PTA \geq 90\%$  was achieved for a maximum MIC of 8  $\mu\text{g/mL}$ ; however, in patients with  $CL_{cr} < 10$  mL/min for which daily doses of meropenem infused 0.5h were significantly reduced, nevertheless all regimens achieved  $PTA \geq 90\%$  against MIC of 16  $\mu\text{g/mL}$ .

Table 2 shows the PTAs achieved by monotherapy and combination therapy regimens for the pharmacodynamic indices for fosfomycin at  $40.8 fAUC/MIC$  ( $CL_{cr} > 40$  mL/min) and for meropenem at  $40\% fT > MIC$  ( $CL_{cr} > 50$  mL/min) against  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  from the collection of multidrug resistant *P. aeruginosa*. All monotherapy

regimens did not reach the appropriate PTA (PTA  $\geq 90\%$ ) against MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>. However in combination, the three largest fosfomycin regimens and all meropenem regimens evaluated against MIC<sub>50</sub> achieved PTAs  $\geq 90\%$ . Against MIC<sub>90</sub>, no fosfomycin or meropenem regimen achieved PTA  $> 90\%$ .

Table 3 shows the CFR for each dosing regimen of fosfomycin at 40.8  $fAUC/MIC$  (CL<sub>cr</sub>  $>40$  mL/min) and meropenem at 40%  $fT > MIC$  (CL<sub>cr</sub>  $>50$  mL/min) as monotherapy and combination therapy. The meropenem or fosfomycin regimens evaluated as monotherapy provided a probability of no more than 65% CFR. However, all combined fosfomycin regimens provided a CFR  $\geq 81\%$ ; the 8g q8h regimen resulted in 91% CFR. The four meropenem regimens (0.5h-infusion: 1.5g q6h, 2g q8h; 3h-infusion: 1.5g q6h, 2g q8h) resulted in CFR  $\geq 79\%$ , based on the distribution of MIC values in the combination with fosfomycin.

Table 4 shows the PTA (%) provided by the meropenem regimens at 40%  $fT > MIC$  according to the minimal inhibitory concentrations, the duration of intravenous infusion (0.5 h or 3 h) and creatinine clearance. Meropenem regimens (for example, 1 g q8h as 0.5-h infusion), when increased to 1.5 g q6h as 3 h infusion in patients with CL<sub>cr</sub>  $>50$  mL/min against MIC of 16 $\mu$ g/mL, provided a significant increase in PTA from 61.6% to 90.7%, respectively. However, it is noticeable that prolonged infusion effect on PTA became less important with the reduction in CL<sub>cr</sub> values.

## DISCUSSION

MBLs are not inhibited by tazobactam, sulbactam, clavulanic acid, avibactam or vaborbactam, and have the capacity to enzymatically degrade carbapenems, which are the antibiotic of last resort (42, 43). These properties make MBLs a major concern for healthcare professionals. This study is the first to evaluate the presence

of synergism of meropenem and fosfomycin against isolates of MBL- and non-MBL-producing *P. aeruginosa* including the pharmacodynamic action achieved by the antimicrobial combination, which strongly suggested synergism of activities.

Although the FICI is one of the most common methods to evaluate the *in vitro* synergism of antimicrobial combinations, we also analyze the synergic action of the combination by Loewe Additivity Index method that is based on the theory of the surface model (22, 23). The purpose of evaluating by two mathematical methods was to provide more veracity and robustness to the results of the synergism tests, since it is still a scientific challenge to classify synergistic activities of two or more drugs (8, 44). The two methods showed comparable results, demonstrating that the combination of meropenem with fosfomycin was synergistic for the majority of isolates for both methods.

In three isolates (PA-87, PA-149, PA-114), the antimicrobial combination were classified by FICI as indifferent and by the Loewe Additivity Index as synergistic.(22, 23) . If we exclude the three meropenem-sensitive isolates (PA-114, PA-64, PA-69), which were included in the study to provide larger variability of sensitivity but would not be treated clinically by antimicrobial combination, the percentages of synergism would be even better, reaching 100% and 87.5% by Loewe Additivity Index and FICI, respectively.

All isolates harboring MBLs exhibited synergism for the combination by the two tests used, however in the non-MBLs, 4 isolates were indifferent to the FICI test and 1 isolate was antagonistic by Loewe's Additivity Index. Numerically, the most pronounced synergistic action of the combination was against MBL-producing *P. aeruginosa*, which demonstrated a median reduction of 8-fold versus only 4-fold for the non-MBL isolates. In view of the limited number of new antimicrobial agents and

the rapid rise in bacterial resistance, combination therapy with two or more agents in optimized regimens using PK/PD approach has become a viable alternative to rescue these “old” antimicrobials, and to combat multidrug-resistant Gram-negative bacteria (8, 45, 46).

The current study is an important addition to the experience of fosfomicin combination against MBL. All fosfomicin dose regimens evaluated achieved a pharmacodynamic index ( $AUC/MIC \geq 40.8$ ) with  $PTA \geq 90\%$  at  $MIC = 16 \mu\text{g/mL}$ , thus suggesting that this value would have potential for PK/PD breakpoint sensitive against *P. aeruginosa*, since both committees (CLSI and EUCAST) do not provide breakpoints for fosfomicin against *P. aeruginosa*. Coincidentally, Okazaki et al in an *in vitro* study evaluating the synergism of fosfomicin in combination with other antimicrobials against multidrug-resistant *P. aeruginosa* and used  $MIC \leq 16 \mu\text{g/mL}$  as sensitive breakpoint for fosfomicin, but the author did not explain why he chose this value (47). The higher pharmacodynamic reach provided by higher regimens (6 g q6h; 8 g q8h) reaching  $PTA > 90\%$  against  $MIC = 32 \mu\text{g/mL}$ , shown also by our study, suggest a possible better coverage with higher fosfomicin dosing regimens.

Although our results are close to the EUCAST's susceptible breakpoint for fosfomicin against enterobactereaceae ( $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ ), we need to be careful to evaluate them before proposing any recommendations. The pharmacodynamic index of fosfomicin used in our evaluation ( $AUC/MIC \geq 40.8$ ) originated from a neutropenic mouse infection model study that used only one clinical isolate of *P. aeruginosa* which does not harbor MBLs. The same study evaluated 5 isolates of *E. coli* and provided a wide variation of  $AUC/MIC$  with range from 27.5 to 193 (24). Thus, we performed another pharmacodynamic evaluation using the worst result against *E. coli* ( $AUC/MIC \geq 193$ ), and the maximum reach by all fosfomicin regimens with  $PTA$

≥90% was at MIC of 4 µg/mL, and only fosfomycin 8g q8h reached PTA ≥90% at MIC of 8 µg/mL. This variability demonstrates that we need new studies and more robust data to propose a PK/PD breakpoint for fosfomycin against *P. aeruginosa*.

Evaluation of PTA of fosfomycin alone or in combination therapy clearly demonstrates the synergistic action between the two antimicrobials. All fosfomycin monotherapy regimens did not reach PTA ≥ 90% at MIC = 16 µg/mL for any challenged isolates; however, the three major regimens combined with meropenem achieved PTA ≥ 90% for 14 (74%) isolates, thus demonstrating greater coverage when combination therapy is used. These results are consistent with other *in vitro* and clinical studies demonstrating the increased action of fosfomycin in combination with other classes of antimicrobials, due to their different mechanisms of action, supporting the clinical adoption of antibiotic combination with fosfomycin (11, 48-50). Pharmacodynamic assessment also showed that the reach of the PTA was maintained or even increased, even with reduction in the daily dose of fosfomycin for  $CL_{cr} \leq 40$  mL/min. Therefore, the regimens proposed by the manufacturer for renal dysfunction are well determined to achieve comparable PTA; the reduced regimens do not expose patients with renal impairment to subtherapeutic dose.

The reason for recommending fosfomycin in combination in the treatment of severe infections is due to its great capacity for synergism with other agents, as demonstrated in this study, and the possibility of developing resistance during treatment when used as a single agent (51). There are several resistance mechanisms capable of reducing the sensitivity of fosfomycin (52). Hamou-Segarra et al. evaluating *P. aeruginosa* mutant isolates defective in several components of the peptidoglycan recycling system exposed to fosfomycin and imipenem alone or in combination, showed that hyperproduction of ampC significantly increased

susceptibility to fosfomicin (53). Using a hollow fiber infection model, Drusano et al. evaluated meropenem and fosfomicin against *P. aeruginosa* with high inoculum ( $8.18 \log_{10}$  CFU/mL), and demonstrated that the combination resulted in significant synergism and was also able to contain the amplification of the subpopulation of resistant mutants for both antimicrobials; the authors speculated that the different mechanisms of action of the agents and the ampC hyperproduction, commonly expressed in the presence of carbapenems, could be responsible for these positive effects (54).

The PTA analysis for meropenem monotherapy showed that the evaluated regimens reach higher MIC values than the CLSI breakpoint for sensitive criteria ( $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ). The fact that all meropenem dose regimens in monotherapy achieved PTA  $\geq 90\%$  for MIC of  $4 \mu\text{g/mL}$  (an intermediate breakpoint by CLSI) and the regimens (1.5 g q6h, 2 g q8h as 0.5 or 3 h infusion) achieved PTA  $\geq 90\%$  for MIC of  $8 \mu\text{g/mL}$  (resistant breakpoint by CLSI), demonstrates the possible existence of greater margins in the meropenem regimens to be exploited against higher MICs, and may also justify the greater value of the resistant breakpoint ( $> 8 \mu\text{g/mL}$ ) as defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for this carbapenem (55). In addition, PK/PD simulations can be used to determine individualized meropenem regimens against MDR infection, for example using prolonged infusion duration (56, 57).

To maximize antimicrobial activity of time-dependent agents ( $\%fT_{>MIC}$ ) with short half-life, such as meropenem and other beta-lactams, the following strategies are normally used: increasing the conventional doses by maintaining the intervals between doses; keep conventional doses or even reduce them, administering more frequently; increase intravenous infusion time; or the combination of these

approaches. These changes in the conventional regimes, called optimization, are beneficial because they maintain the free concentration of antimicrobial above the MIC, thus providing greater bacterial killing power, less chance of selecting resistant isolates, lower antimicrobial and treatment costs, and better therapeutic results, as demonstrated by *in vitro*, animal and clinical studies (58, 59).

The three strategies were used in our pharmacodynamic evaluation. Its positive effects favoring the increase of the PTA were clearly noticed in patients with  $CL_{cr} > 50$  mL/min and against the less susceptible MICs; however, this advantage decreased with increasing renal impairment because the drug half-life is increased in this patient population wherein  $fAUC/MIC$  becomes the predominant pharmacodynamic characteristics (60). Results similar to ours were demonstrated by Zelenitsky et al. who compared bolus versus extended infusions of piperacillin/tazobactam (another beta-lactam) and found that prolonged infusions is advantageous only to less susceptible pathogens ( $MIC \geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ) (61); Isla et al. evaluating meropenem regimens in different ranges of renal function by Monte Carlo simulation, observed in patients with  $CL_{cr}$  of 100 mL/min that 2 g q8h-infusion 0.5 h versus 2 g q8h-infusion 3 h provided  $\%fT > MIC$  of 40% for MICs of 8 and 16  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and for patients with  $CL_{cr}$  of 35 mL/min, both infusion durations provided coverage for the same MIC (32  $\mu\text{g/mL}$ ) (62). These results suggested that the extended infusion should not be used in a generalized way, and should be preceded by careful evaluation of the factors involved, which may contribute to the therapeutic success against less susceptible pathogens and empirical treatments.

The comparison between the PTAs of the meropenem in monotherapy and combination therapy regimens, demonstrates the importance of the addition of fosfomycin to potentiate the action of meropenem, thus recovering the utility of the

carbapenem. Considering the PTA > 90% in MIC = 8 µg/mL, the combined regimens of meropenem (1.5 g q6h; 2 g q8h) infusion in 0.5 h and 3 h resulted in a 57% increase in the coverage of the isolates, when compared to monotherapy.

Fosfomycin should be combined with other antimicrobial when treating complicated upper urinary tract infections (e.g. pyelonephritis) and complicated systemic infections also in order to prevent the development of resistance during treatment (45). Fosfomycin activity is also enhanced in an acidic environment (63). Okazaki et al. analyzed the *in vitro* synergy in activity of fosfomycin combined with 8 antimicrobials in pairs by an efficacy time index assay against 30 isolates of multidrug-resistant *P. aeruginosa* and showed that the combination of fosfomycin with meropenem obtained the second best result in 76.6% of the isolates, being only 0.1% lower than the best result (47). Kastoris et al. surveyed *in vitro* studies of synergism of fosfomycin combined with other antimicrobials against *P. aeruginosa* and in one of these studies, fosfomycin showed synergism in 70% of the isolates when combined with either aztreonam, cefepime, ceftazidime, gentamicin, imipenem or levofloxacin (64). In a clinical study, Mirakhur et al followed 15 patients with pulmonary exacerbation due to cystic fibrosis colonized by multidrug-resistant *P. aeruginosa* treated with 5g q8h fosfomycin in combination with other antimicrobials in pairs, including meropenem, obtained clinical improvement in 93% of the patients (65). In a clinical case, Seijas et al. reported a successful treatment of a septic patient caused by New Delhi MBL-producing *Morganella morgani* sensitive to fosfomycin alone, using the combined regimen of meropenem 2g q8h and fosfomycin 4g q8h (66).

The pharmacodynamic evaluations including the MICs provided by the combination of these agents indicate a potential to restore the activities of these

antimicrobials. The shift in MIC in the combination resulted in meropenem sensitivity in 44%, allowing PTA  $\geq$  90% for all meropenem regimens and for the three biggest fosfomycin regimens against MIC<sub>50</sub>. The estimation of the marginal PTA of meropenem against *P. aeruginosa* in the current study was conservative, given that the selection process for the bacteria had a propensity towards isolates with higher MIC values than the actual distribution in the general population. In fact, the higher clinical dose in the combination of meropenem and fosfomycin would exceed the PTA for the more common *P. aeruginosa* infections. The results reinforces the potential to restore utility of these antimicrobial agents through combination strategy against infections caused by MDR bacteria (67). Although the methods of evaluation of synergism *in vitro* sometimes present controversial clinical reproducibility, Jean et al., evaluating the combination of tigecycline and imipenem/cilastatin in 28 patients with ventilator-associated pneumonia due to extensively drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii*, demonstrated a good correlation between checkerboard test and the lowest 30-day mortality of the patients treated with this combination (68). Comparing the synergistic action between antimicrobial combinations against extended-drug-resistant *A. baumannii*, Bremmer et al. also demonstrated by checkerboard and clinical study that the combination consisting of minocycline with colistin was superior to meropenem with colistin, with microbiological eradication in 88% of the patients vs 30% ( $p = 0.025$ ), respectively (69). These studies support the use of checkerboard information in the PTA determination to optimize combination dosing regimens in the clinical settings where no monotherapy option is available for MDR infections.

The limitation of this study is the small number of clinical isolates evaluated. However, they started from a large initial number of isolates (547 units) collected

from two large health centers in the southern part of Brazil, and those 19 isolates selected are from different clones analyzed molecularly. In addition, 10 of the 19 isolates are MBL producers identified by molecular analysis, which made it possible to compare behavioral synergistic differences between MBL and non-MBL isolates.

In conclusion, the favorable results for meropenem and fosfomycin combination were observed through synergism analysis and PK/PD evaluation. The current study demonstrated that the use of the two-antimicrobial combination through dose optimization has the potential to combat infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, even against those MBL-producing isolates.

## **Acknowledgements**

We thank the laboratory assistants at the microbiology laboratory of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, for performing a part of the microbiological analyzes presented in this work.

## **Funding**

Maria Cristina Bronharo Tognim received funding from the Coordination Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and Foundation Araucaria. As these government funds are designed to encourage higher education training in Brazil, they only cover the cost of laboratory materials.

## **Transparency declarations**

None to declare.

## References

1. Liu Q, Li X, Li W, Du X, He JQ, Tao C, Feng Y. 2015. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. *Sci Rep* 5:11715.
2. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. 2016. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 306:48-58.
3. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, Marei HE, Ashour HM. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol* 10:1683-706.
4. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 11:381-93.
5. Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2:65.
6. Oo C, Sy SKB. 2018. Fixed-dose combinations: a potential means to boost drug development for selected drugs. *Drug Discov Today* 23:457-459.
7. Tumbarello M, Treçarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, Losito AR, Bartoletti M, Del Bono V, Corcione S, Maiuro G, Tedeschi S, Celani L, Cardellino CS, Spanu T, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viscoli C, Viale P, Isgri S. 2015. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 70:2133-43.
8. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 25:450-70.
9. Tangden T. 2014. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci* 119:149-53.
10. Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G, De Rosa FG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rossolini GM, Righi E, Karaiskos I, Tumbarello M, Nicolau DP, Viale PL, Poulakou G, Critically Ill Patients Study Group of the European Society of Clinical M, Infectious D, Hellenic Society of C, Societa Italiana di Terapia A. 2017. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2017.08.030.
11. Albiero J, Sy SK, Mazucheli J, Caparroz-Assef SM, Costa BB, Alves JL, Gales AC, Tognim MC. 2016. Pharmacodynamic Evaluation of the Potential Clinical Utility of Fosfomicin and Meropenem in Combination Therapy against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4128-39.
12. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. 2009. Fosfomicin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents* 34:111-20.
13. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943-60.

14. Lepe JA, Torres MJ, Smani Y, Parra-Millan R, Pachon J, Vazquez-Barba I, Aznar J. 2014. In vitro and intracellular activities of fosfomycin against clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *Int J Antimicrob Agents* 43:135-9.
15. Hayashi I, Sakurai M, Karato A, Ichiki M, Sekine I, Ishikawa T, Shiotani J, Yoshida T, Niida M, Ogawa M, et al. 1994. [Laboratory and clinical studies on combined effects of fosfomycin plus sulbactam/cefoperazone for mixed infections of MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*]. *Jpn J Antibiot* 47:991-1005.
16. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119-23.
17. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. 2002. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 40:2755-9.
18. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. 2008. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 46:2028-37.
19. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-9.
20. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. 2004. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:847-51.
21. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. 2004. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4654-61.
22. Pillai SK, Moellering R, Eliopoulos GM. 2005. *Antimicrobial combinations*, 5th ed, p 365-440. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
23. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-85.
24. Lepak AJ, Zhao M, VanScoy B, Taylor DS, Ellis-Grosse E, Ambrose PG, Andes DR. 2017. In vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) in the Neutropenic Murine Thigh Infection Model against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.00476-17.
25. Nicolau DP. 2008. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. *Clin Infect Dis* 47 Suppl 1:S32-40.
26. Fosfomycin Intravenous. Available from: <https://medikamio.com/de-at/medikamente/fosfomycin-sandoz-4-g-iv-trockensubstanz-zur-infusionsbereitung/pil>. (accessed 03.04.2019).
27. Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Drusano GL. 2007. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin Infect Dis* 44:357-63.
28. Feher C, Rovira M, Soriano A, Esteve J, Martinez JA, Marco F, Carreras E, Martinez C, Fernandez-Aviles F, Suarez-Lledo M, Mensa J. 2014. Effect of meropenem administration in extended infusion on the clinical outcome of

- febrile neutropenia: a retrospective observational study. *J Antimicrob Chemother* 69:2556-62.
29. Sy SK, Asin-Prieto E, Derendorf H, Samara E. 2014. Predicting pediatric age-matched weight and body mass index. *AAPS J* 16:1372-9.
  30. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2018. A mathematical model-based analysis of the time-kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 73:1295-1304.
  31. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2018. A model-based analysis of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) indices of avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2018.10.014.
  32. Meropenem [package insert]. Cotia, SP: AstraZeneca do Brasil Ltda; 2013. Available from:  
[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6501872013&pIdAnexo=1733955](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6501872013&pIdAnexo=1733955)
  33. Cockcroft DW, Gault MH. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41.
  34. Muro T, Sasaki T, Hosaka N, Umeda Y, Takemoto S, Yamamoto H, Kamimura H, Higuchi S, Karube Y. 2011. Population pharmacokinetic analysis of meropenem in Japanese adult patients. *J Clin Pharm Ther* 36:230-6.
  35. Wong G, Farkas A, Sussman R, Daroczi G, Hope WW, Lipman J, Roberts JA. 2015. Comparison of the accuracy and precision of pharmacokinetic equations to predict free meropenem concentrations in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1411-7.
  36. Parker SL, Frantzeskaki F, Wallis SC, Diakaki C, Giamarellou H, Koulenti D, Karaikos I, Lipman J, Dimopoulos G, Roberts JA. 2015. Population Pharmacokinetics of Fosfomycin in Critically Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6471-6.
  37. Goto M, Sugiyama M, Nakajima S, Yamashina H. 1981. Fosfomycin kinetics after intravenous and oral administration to human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 20:393-7.
  38. Parker S, Lipman J, Koulenti D, Dimopoulos G, Roberts JA. 2013. What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 42:289-93.
  39. Wang W, Hallow KM, James DA. 2016. A Tutorial on RxODE: Simulating Differential Equation Pharmacometric Models in R. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 5:3-10.
  40. Tuszynski J. 2018. caTools: tools moving window statistics. R package version 1.17.1.1.
  41. R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
  42. Rotondo CM, Wright GD. 2017. Inhibitors of metallo-beta-lactamases. *Curr Opin Microbiol* 39:96-105.
  43. Palzkill T. 2013. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci* 1277:91-104.
  44. Tang J, Wennerberg K, Aittokallio T. 2015. What is synergy? The Saariselka agreement revisited. *Front Pharmacol* 6:181.

45. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. 2013. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:1333-53.
46. Kostyanev T, Bonten MJ, O'Brien S, Steel H, Ross S, Francois B, Tacconelli E, Winterhalter M, Stavenger RA, Karlen A, Harbarth S, Hackett J, Jafri HS, Vuong C, MacGowan A, Witschi A, Angyalosi G, Elborn JS, deWinter R, Goossens H. 2016. The Innovative Medicines Initiative's New Drugs for Bad Bugs programme: European public-private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 71:290-5.
47. Okazaki M, Suzuki K, Asano N, Araki K, Shukuya N, Egami T, Higurashi Y, Morita K, Uchimura H, Watanabe T. 2002. Effectiveness of fosfomycin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using the efficacy time index assay. *J Infect Chemother* 8:37-42.
48. Reffert JL, Smith WJ. 2014. Fosfomycin for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections. *Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacotherapy* 34:845-57.
49. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, Oikonomou A, Poulakou G, Roilides E, Giamarellou H. 2014. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 43:52-9.
50. Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G, De Rosa FG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rossolini GM, Righi E, Karaiskos I, Tumbarello M, Nicolau DP, Viale PL, Poulakou G, Critically Ill Patients Study Group of the European Society of Clinical M, Infectious D, Hellenic Society of C, Societa Italiana di Terapia A. 2018. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect* 24:133-144.
51. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. 2016. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev* 29:321-47.
52. Silver LL. 2017. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7.
53. Hamou-Segarra M, Zamorano L, Vadlamani G, Chu M, Sanchez-Diener I, Juan C, Blazquez J, Hattie M, Stubbs KA, Mark BL, Oliver A. 2017. Synergistic activity of fosfomycin, beta-lactams and peptidoglycan recycling inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 72:448-454.
54. Drusano GL, Neely MN, Yamada WM, Duncanson B, Brown D, Maynard M, Vicchiarelli M, Louie A. 2018. The Combination of Fosfomycin plus Meropenem Is Synergistic for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
55. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>
56. Sy SK, Zhuang L, Derendorf H. 2016. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 12:93-114.
57. Sy SKB, Zhuang L, Sy S, Derendorf H. 2018. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ceftazidime-Avibactam Combination: A Model-

- Informed Strategy for its Clinical Development. Clin Pharmacokinet doi:10.1007/s40262-018-0705-y.
58. Mattoes HM, Kuti JL, Drusano GL, Nicolau DP. 2004. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem. Clin Ther 26:1187-98.
  59. Rizk NA, Kanafani ZA, Tabaja HZ, Kanj SS. 2017. Extended infusion of beta-lactam antibiotics: optimizing therapy in critically-ill patients in the era of antimicrobial resistance. Expert Rev Anti Infect Ther 15:645-652.
  60. Kristoffersson AN, David-Pierson P, Parrott NJ, Kuhlmann O, Lave T, Friberg LE, Nielsen EI. 2016. Simulation-Based Evaluation of PK/PD Indices for Meropenem Across Patient Groups and Experimental Designs. Pharm Res 33:1115-25.
  61. Zelenitsky S, Nash J, Weber Z, Iacovides H, Ariano R. 2016. Targeted benefits of prolonged-infusion piperacillin-tazobactam in an in vitro infection model of Pseudomonas aeruginosa. J Chemother 28:390-4.
  62. Isla A, Canut A, Arribas J, Asin-Prieto E, Rodriguez-Gascon A. 2016. Meropenem dosing requirements against *Enterobacteriaceae* in critically ill patients: influence of renal function, geographical area and presence of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 35:511-9.
  63. Fedrigo NH, Mazucheli J, Albiero J, Shinohara DR, Lodi FG, Machado A, Sy SKB, Tognim MCB. 2017. Pharmacodynamic Evaluation of Fosfomycin against Escherichia coli and Klebsiella spp. from Urinary Tract Infections and the Influence of pH on Fosfomycin Activities. Antimicrob Agents Chemother 61.
  64. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. 2010. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. Eur J Clin Pharmacol 66:359-68.
  65. Mirakhur A, Gallagher MJ, Ledson MJ, Hart CA, Walshaw MJ. 2003. Fosfomycin therapy for multiresistant Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2:19-24.
  66. Seija V, Medina Presentado JC, Bado I, Papa Ezdra R, Batista N, Gutierrez C, Guirado M, Vidal M, Nin M, Vignoli R. 2015. Sepsis caused by New Delhi metallo-beta-lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing Morganella morganii, treated successfully with fosfomycin and meropenem: case report and literature review. Int J Infect Dis 30:20-6.
  67. Decker B, Masur H. 2015. Bad bugs, no drugs: are we part of the problem, or leaders in developing solutions? Crit Care Med 43:1153-5.
  68. Jean SS, Hsieh TC, Hsu CW, Lee WS, Bai KJ, Lam C. 2016. Comparison of the clinical efficacy between tigecycline plus extended-infusion imipenem and sulbactam plus imipenem against ventilator-associated pneumonia with pneumonic extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii bacteremia, and correlation of clinical efficacy with in vitro synergy tests. J Microbiol Immunol Infect 49:924-933.
  69. Bremmer DN, Bauer KA, Pouch SM, Thomas K, Smith D, Goff DA, Pancholi P, Balada-Llasat JM. 2016. Correlation of Checkerboard Synergy Testing with Time-Kill Analysis and Clinical Outcomes of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Respiratory Infections. Antimicrob Agents Chemother 60:6892-6895.

## Figure legends

Figure 1: MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental fosfomycin MICs in monotherapy and in combination with meropenem and probability of target attainment of  $fAUC/MIC \geq 40.8$  for the fosfomycin dosing regimens of 4 g q8h, 4 g q6h, 6 g q6h, 8 g q8h ( $CL_{cr} >40$  mL/min), 2.8 g q6h, 2.8 g q8h, 4.2 g q8h, 5.6 g q8h ( $CL_{cr} 20 - 40$  mL/min), 2 g q6h, 2 g q8h, 3 g q8h, 4 g q6h ( $CL_{cr} 10 - <20$  mL/min) and 1.2 g q6h, 1.2 g q8h, 1.8 g q8h, 2.4 g q6h ( $CL_{cr} <10$  mL/min) in critically ill virtual patients.

Figure 2: MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental fosfomycin MICs in monotherapy and in combination with meropenem and probability of target attainment of  $fAUC/MIC \geq 193$  (worst-case scenario) for the fosfomycin dosing regimens of 4 g q8h, 4 g q6h, 6 g q6h, 8 g q8h ( $CL_{cr} >40$  mL/min), 2.8 g q6h, 2.8 g q8h, 4.2 g q8h, 5.6 g q8h ( $CL_{cr} 20 - 40$  mL/min), 2 g q6h, 2 g q8h, 3 g q8h, 4 g q6h ( $CL_{cr} 10 - <20$  mL/min) and 1.2 g q6h, 1.2 g q8h, 1.8 g q8h, 2.4 g q6h ( $CL_{cr} <10$  mL/min) in critically ill virtual patients.

Figure 3: MIC frequency of 19 *P. aeruginosa* clinical isolates (non-MBL and MBL-producing) in incremental meropenem MICs in monotherapy and in combination with fosfomycin and probability of target attainment of  $40\% fT > MIC$  for the meropenem dosing regimens of 1 g q8h, 2 g q8h, and 1.5 g q6h ( $CL_{cr} >50$  mL/min), 1 g q12h, 1 g q6h, 2 g q12h ( $CL_{cr} >25 - 50$  mL/min), 0.5 g q12h, 0.5 g q6h, 1 g q12h ( $CL_{cr} 10 - 25$  mL/min), 0.5 g q24h, 0.5 g q12h, 1 g q24h ( $CL_{cr} <10$  mL/min) in critically ill virtual patients.

In the graphs shown to the left, all meropenem regimens were infused over 0.5 hours, and in the graphs shown to the right, all meropenem regimens were infused over 3 hours.

Fig 1

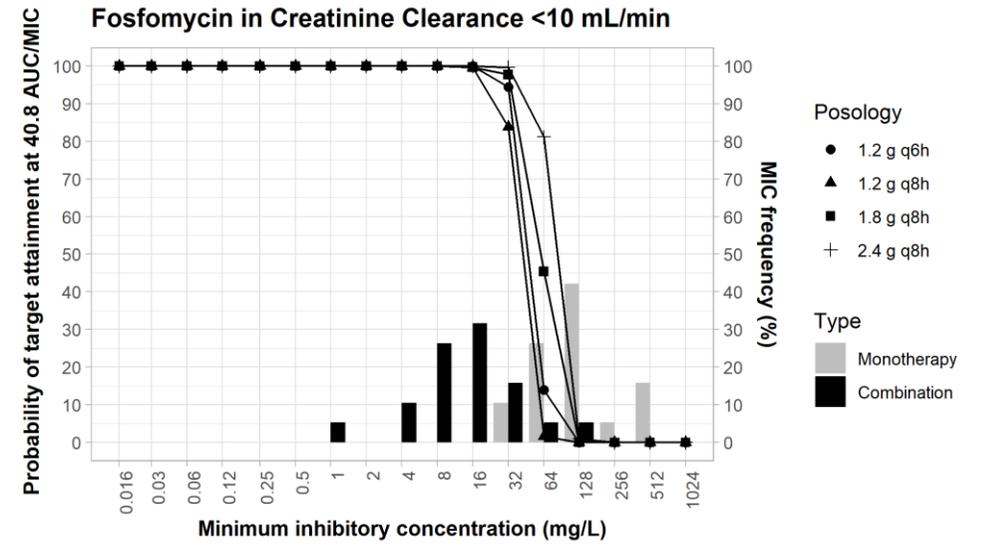
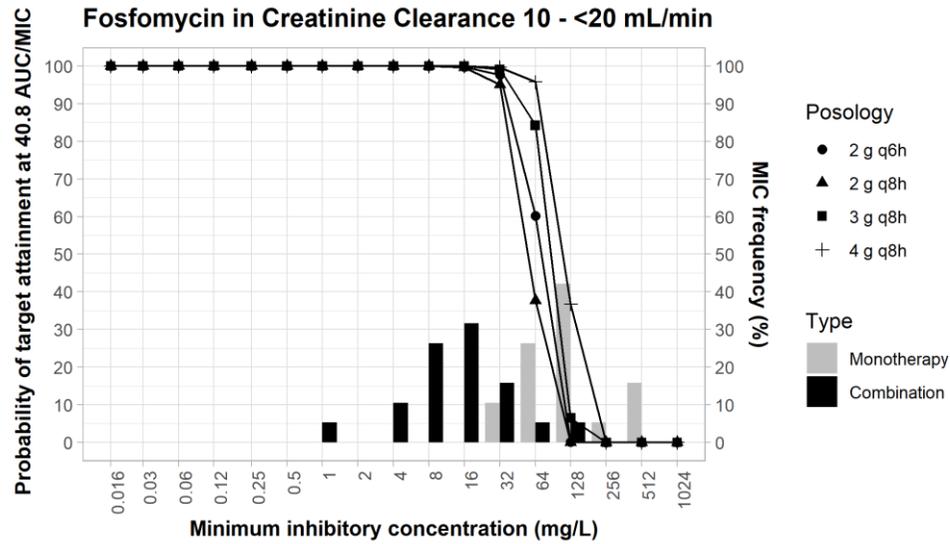
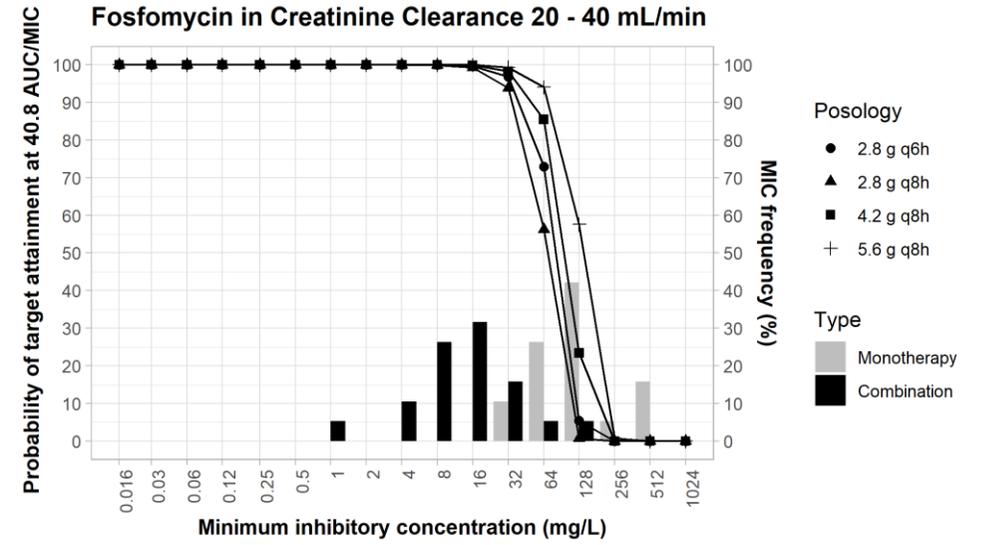
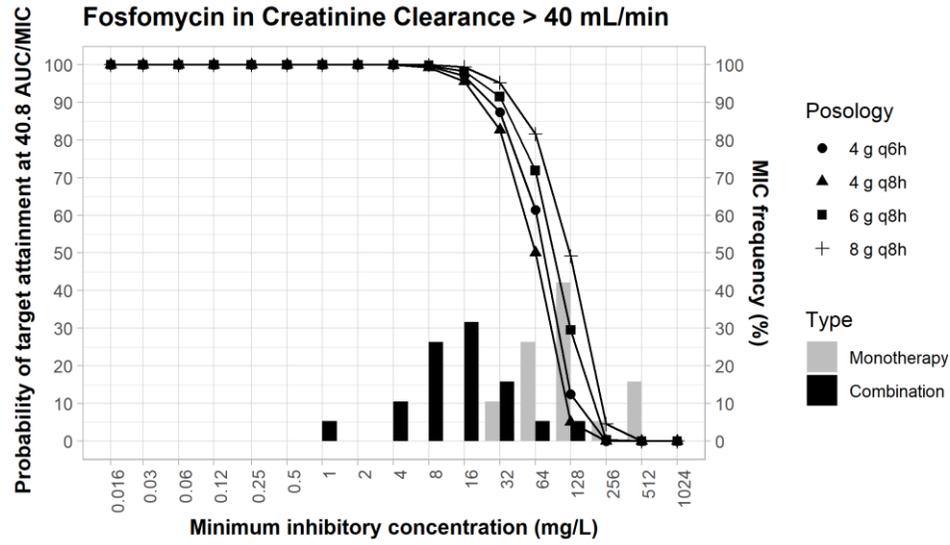
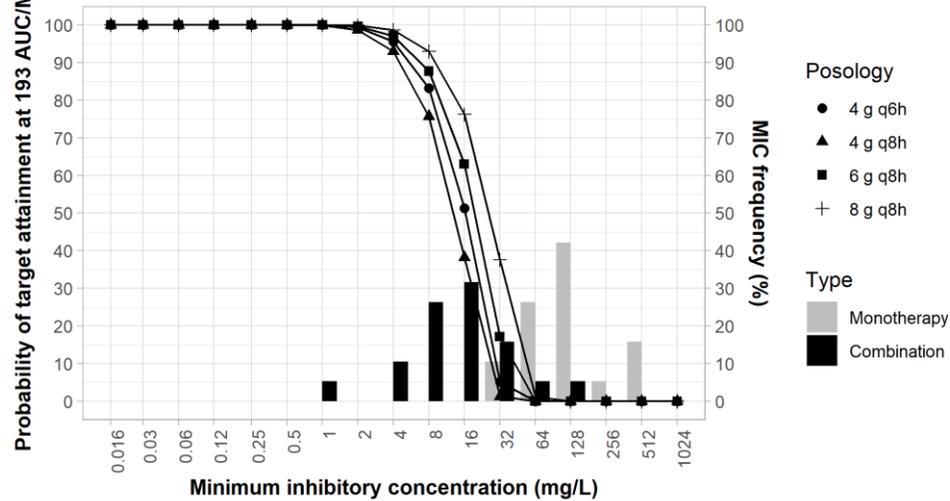
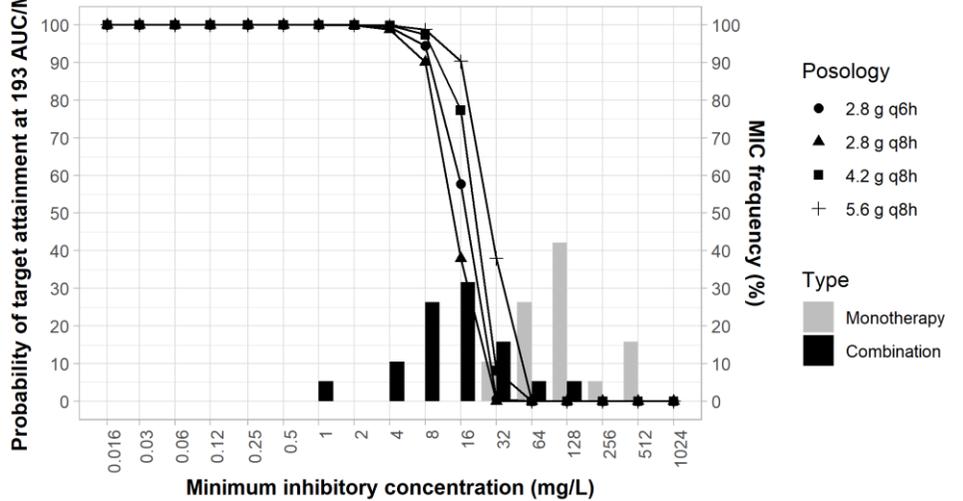


Fig 2

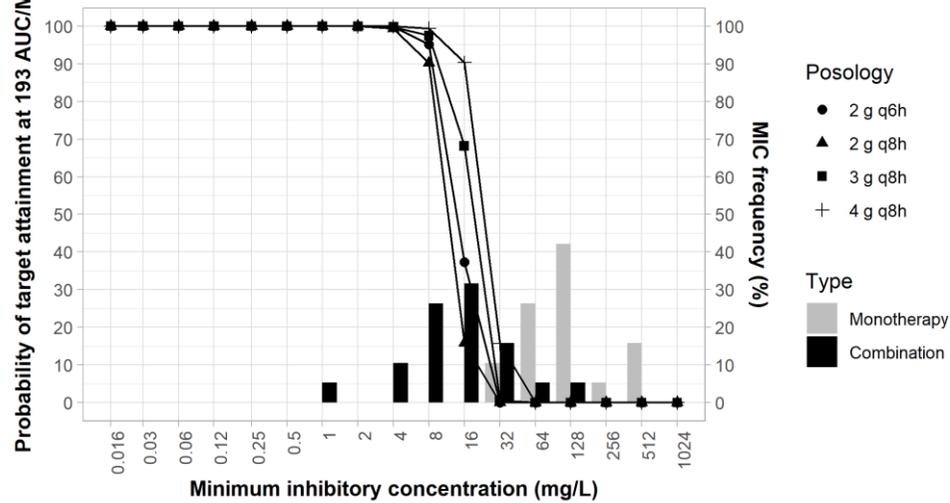
**Fosfomycin in Creatinine Clearance > 40 mL/min**



**Fosfomycin in Creatinine Clearance 20 - 40 mL/min**



**Fosfomycin Creatinine Clearance 10 - <20 mL/min**



**Fosfomycin in Creatinine Clearance <10 mL/min**

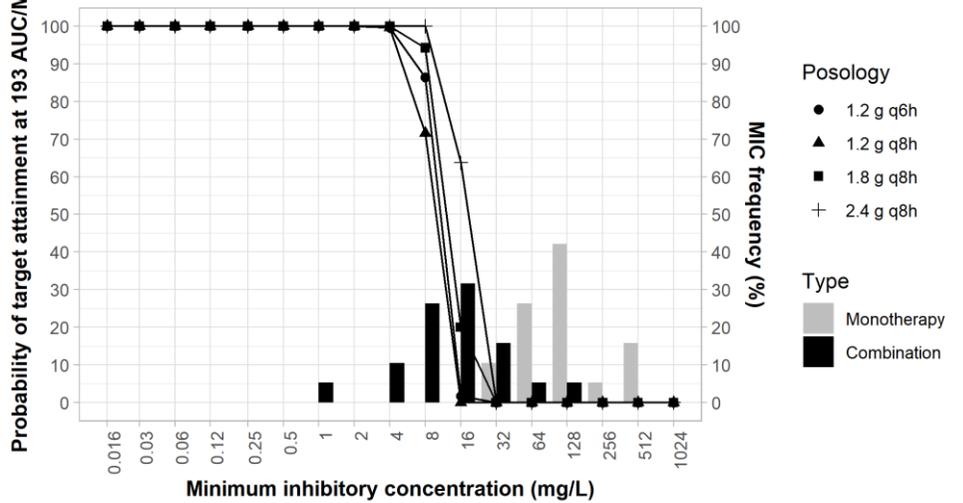


Fig 3

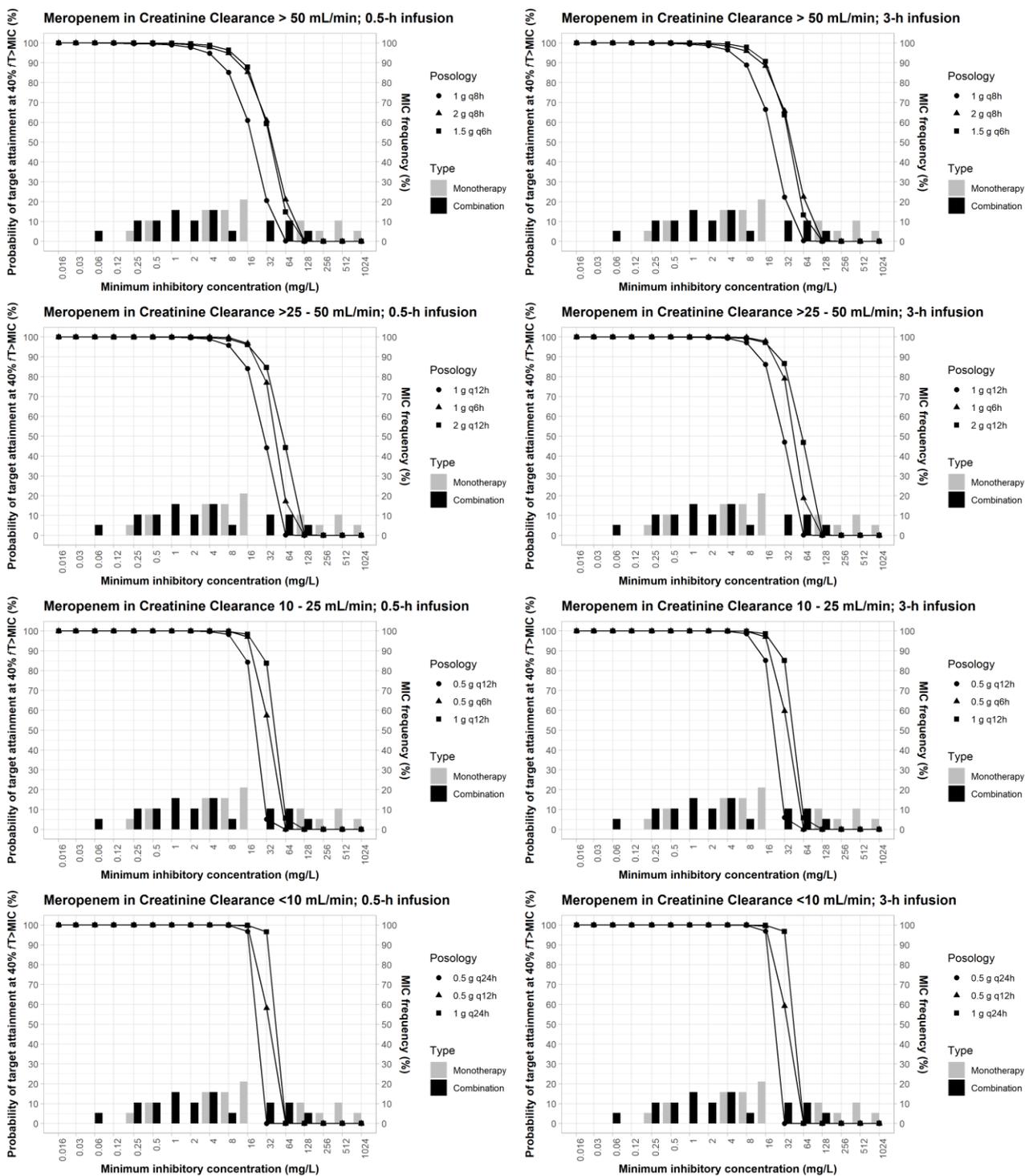


Table 1: Minimum inhibitory concentrations (MIC) of meropenem and fosfomycin alone or in combination against non-MBL and MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates by fractional inhibitory concentration index (FICI) and Loewe additivity index analysis

<i>P. aeruginosa</i> isolates	MIC Mero ( $\mu\text{g/mL}$ )			MIC Fosfo ( $\mu\text{g/mL}$ )			Synergism Analysis			
	Mero Alone	Mero combination	Mero fold reduction	Fosfo Alone	Fosfo combination	Fosfo fold reduction	FICI	S or I based on FICI	Loewe additivity Index	S or A based on Loewe additivity index
PA-73	4	0.5	8	128	16	8	0.25	S	0.75	S
PA-87	4	2	2	128	32	4	0.75	I	0.25	S
PA-116	16	1	16	64	8	8	0.19	S	0.81	S
PA-106	16	4	4	64	4	16	0.50	S	0.69	S
PA-146	16	4	4	32	8	4	0.50	S	0.50	S
PA-149	128	64	2	128	16	8	0.62	I	0.38	S
PA-114	0.50	0.25	2	64	8	8	0.62	I	0.38	S
PA-64	0.25	0.06	4	32	8	4	0.49	S	0.51	S
PA-69	0.50	0.50	-	128	128	-	2.00	I	-1	A
PA-30*	16	4	4	512	8	64	0.26	S	0.73	S
PA-43*	4	0.25	8	512	1	512	0.06	S	0.90	S
PA-314*	8	2	4	128	4	32	0.28	S	0.72	S
PA-524*	8	1	8	64	16	4	0.37	S	0.62	S
PA-13*	512	128	4	64	16	4	0.50	S	0.50	S
PA-525*	1024	32	32	128	16	8	0.16	S	0.85	S
PA-573*	128	8	16	512	64	8	0.19	S	0.81	S
PA-377*	256	32	8	128	32	4	0.37	S	0.63	S
PA-170*	8	1	8	128	32	4	0.37	S	0.63	S
PA-GIM*	512	64	8	256	16	16	0.19	S	0.81	S
MIC <sub>50</sub>	16	2		128	16					
MIC <sub>90</sub>	512	64		512	64					

Mero, meropenem; Fosfo, fosfomycin; FICI, fractional inhibitory concentration index; S, synergy; I, indifferent; A, antagonistic; \*, metallo- $\beta$ -lactamases producing.

Table 2: Probabilities of target attainment at pharmacodynamic surrogate indices for fosfomycin at  $40.8 fAUC/MIC$  ( $CL_{cr} >40\text{mL/min}$ ) and for meropenem at  $40\% fT > MIC$  ( $CL_{cr} >50\text{mL/min}$ ) against non-MBL- and MBL-producing *P. aeruginosa* clinical isolates by dosing regimens in monotherapy and combination therapy.

Antimicrobial regimens	Total daily doses	Monotherapy MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	Combination MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	Probabilities of target attainment (%)			
				Monotherapy		Combination	
				MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Fosfomycin		128/512	16/64				
4g iv q8h	12g			0	0	89	16
4g iv q6h	16g			0.4	0	94	33
6g iv q8h	18g			3.1	0	96	46
8g iv q8h	24g			16	0	98	64
Meropenem (0.5-h infusion)		16/512	2/64				
1g q8h	3g			61	0	98	2.5
1.5g q6h	6g			87	0	99	14
2g q8h	6g			85	0	99	21
Meropenem (3-h infusion)							
1g q8h	3g			67	0	99	4.1
1.5g q6h	6g			91	0	100	13
2g q8h	6g			88	0	100	22

Table 3: Cumulative fraction of response (CFR) for fosfomycin at 40.8  $fAUC/MIC$  ( $CL_{cr} > 40 mL/min$ ) and meropenem at 40%  $fT > MIC$  ( $CL_{cr} > 50 mL/min$ ) against non-MBL and MBL-producing *P. aeruginosa* clinical isolates by dosing regimens in monotherapy and combination therapy

Antimicrobial regimens	Total daily doses	CFR (%)	
		Monotherapy	Combination Therapy
Fosfomycin			
4g iv q8h	12g	11%	81%
4g iv q6h	16g	17%	86%
6g iv q8h	18g	22%	88%
8g iv q8h	24g	33%	91%
Meropenem (0.5-h infusion)			
1g q8h	3g	53%	72%
1.5g q6h	6g	63%	79%
2g q8h	6g	62%	79%
Meropenem (3-h infusion)			
1g q8h	3g	56%	73%
1.5g q6h	6g	65%	80%
2g q8h	6g	64%	80%

Table 4. Probability of target attainment (%) surrogate indices for meropenem at 40%  $fT>MIC$  relative to the minimum inhibitory concentration, duration of intravenous infusion (0.5 h and 3 h) and creatinine clearance.

CL <sub>cr</sub> (mL/min)	Dose Regimens	Minimum Inhibitory Concentration (MIC)											
		0.5µg/mL		1µg/mL		2µg/mL		4µg/mL		8µg/mL		16µg/mL	
		0.5 h	3 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h	0.5 h	3 h
≥50	1 g q8h	99.5	99.8	99	99.4	97.8	98.7	94.9	96.5	85.2	88.9	61.6	66.6
	1,5 g q6h	99.9	100	99.8	100	99.6	99.9	98.9	99.5	96.4	97.2	87.8	90.7
	2 g q8h	99.8	99.9	99.6	99.8	99.2	99.4	97.8	98.5	94.8	95.9	85.3	88.4
25 - <50	1 g q12h	99.7	100	99.9	99.9	99.6	99.8	98.9	99.4	95.8	97.2	84.1	86.2
	1 g q6h	100	100	100	100	100	100	100	100	99.8	99.8	96.8	97.9
	2 g q12h	100	100	99.9	100	99.8	99.9	99.6	99.7	99	99.4	96.1	97.2
10 – <25	0.5 g q12h	100	100	100	100	100	100	99.8	99.9	98.3	98.6	84.4	85.2
	0.5 g q6h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.9	97.1	97.1
	1 g q12h	100	100	100	100	100	100	100	100	99.8	99.8	98.4	98.6
<10mL/min	0.5 g q24h	100	100	100	100	100	100	100	100	99.9	100	96.8	99.9
	0.5 g q12h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.5	99.4
	1 g q24h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.9	100

## CAPÍTULO II

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**Manuscrito:** O resgate do meropenem combinado com gentamicina contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

O manuscrito será submetido para: **International Journal Antimicrobial Agents**

34 **Título:** O resgate do meropenem combinado com gentamicina contra  
35 *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

36

37 James Albiero<sup>1</sup>, Josmar Mazucheli<sup>2</sup>, Bruno Buranello Costa<sup>1</sup>, Janio Leal Borges<sup>1</sup>, Ana  
38 Cristina Gales<sup>3</sup>, Sherwin K. B. Sy<sup>2</sup>, Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>1\*</sup>

39

40 <sup>1</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá,  
41 Paraná, Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioestatística, Departamento de  
42 Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório Alerta, divisão  
43 de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Interna, Escola Paulista de Medicina,  
44 Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

45

46

47

48

49

50

51

52

53 **Running Title:** O resgate do meropenem pela gentamicina

54 **\*Autor correspondente:** E-mail: [mcbtognim@uem.br](mailto:mcbtognim@uem.br); Phone: 55-44-3011-4952; Fax: 55-  
55 44-3011-4860; Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de  
56 Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

57

## 58 RESUMO

59 **Introdução:** O tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC  
60 continua desafiador. Embora, recentemente tenham sido liberados novos antimicrobianos  
61 capazes de combatê-los, estes são caros e ainda restritos para alguns serviços. A terapia  
62 combinada com agentes disponíveis mostrou-se viável, mas as posologias não foram  
63 definidas. **Método:** As concentrações inibitórias mínimas (MIC) de meropenem e  
64 gentamicina puros e combinados (metodologia de checkerboard) contra 18 isolados  
65 clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2, foram determinadas. Avaliações farmacodinâmicas  
66 foram realizadas por simulação de Monte Carlo, dos regimes de meropenem (1 g q8h; 1,5  
67 g q6h; 2 g q8h) infundidos em 0.5h ou 3h e gentamicina (490 mg q24h) infundidos em  
68 0.5h. Na insuficiência renal, os regimes foram reduzidos conforme clearance de  
69 creatinina. Foram utilizados os índices farmacodinâmicos e valores:  $\%fT > MIC \geq 40\%$  para  
70 meropenem e  $C_{max}/MIC \geq 10$  para gentamicina. **Resultados e discussão:** A combinação  
71 dos antimicrobianos reduziu as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> do meropenem em 1/32 e 1/8,  
72 respectivamente, e da gentamicina em 1/4 para ambas MICs. Dos isolados resistentes ao  
73 meropenem, oito (44%) tornaram-se sensíveis quando combinado com gentamicina. A  
74 combinação foi sinérgica para 34 (94%) dos testes, e nenhum resultou em antagonismo.  
75 A otimização dos regimes do meropenem combinado com gentamicina ampliou a PTA  
76  $\geq 90\%$  do carbapenem de 3 (17%) isolados na MIC = 4mg/L para 16 (89%) isolados na  
77 MIC = 16 mg/L. A alta frequência de sinergismo verificada entre meropenem e  
78 gentamicina associado a excelente cobertura farmacodinâmica, sugerem que esses  
79 antimicrobianos combinados e otimizados possam ser utilizados para combater infecções  
80 por *K. pneumoniae* KPC.

81

82 **Descritores:** *Klebsiella pneumoniae*; gentamicina, meropenem, combinação de drogas,  
83 método de Monte Carlo.

## 84 INTRODUÇÃO

85 A falta de opções terapêuticas disponíveis para combater infecções causadas por  
86 *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) e sua grande  
87 capacidade de disseminação com altas taxas de morbidade e mortalidade, tornou esse  
88 patógeno um dos mais importantes da atualidade para as agências “*Centers for Disease*  
89 *Control and Prevention*” (CDC) e “*World Health Organization*” (WHO) [1,2]. Embora novos  
90 agentes com atividade antimicrobiana contra estes microrganismos tenham sido  
91 recentemente desenvolvidos, os mesmos apresentam alto custo e ainda permanecem  
92 inacessíveis para a maioria dos serviços de saúde no mundo, sendo urgente avaliar  
93 outros regimes terapêuticos com antimicrobianos amplamente disponíveis [3,4].

94 Estudos clínicos observacionais mostram que a terapia combinada foi mais efetiva  
95 contra infecções por *K. pneumoniae* -KPC que a monoterapia, usando normalmente  
96 carbapenêmicos e/ou aminoglicosídeos, entretanto, não definiram em quais combinações  
97 e posologias [5,6].

98 Os testes matemáticos de sinergismo “*fraction inhibition concentration index*” (FICI)  
99 e índice de aditividade de Loewe, utilizando dados microbiológicos da avaliação *in vitro*  
100 por checkerboard, conseguem apontar se a combinação antimicrobiana é sinérgica,  
101 indiferente ou antagônica contra os isolados de patógenos analisados [7,8].

102 Os importantes benefícios clínicos fornecidos pela aplicação dos conceitos da  
103 farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) na escolha dos regimes antimicrobiano, que  
104 resultou em maiores taxas de sucesso terapêutico e sobrevida, menores custos de  
105 tratamento, principalmente para pacientes críticos com infecção por patógenos  
106 multirresistentes, passou a serem recomendados pelas diretrizes de *stewardship* de  
107 antimicrobianos e agências reguladoras [9,10]. Nesse conceito, regimes posológicos são  
108 planejados para alcançar o valor alvo do antimicrobiano no paciente usando um dos três  
109 índices farmacodinâmicos:  $C_{max}/MIC$ , razão da concentração máxima do agente pela

110 concentração inibitória mínima (MIC) do patógeno;  $ASC_{24h}/MIC$ , razão das área sob a  
111 curva do regime de 24 horas pela MIC do patógeno;  $\%fT>MIC$ , percentagem do período  
112 de tempo entre as doses que a concentração livre do antimicrobiano permanece acima da  
113 MIC [11].

114 Diante da complexidade dos estudos clínicos que exigem muitos profissionais,  
115 longos períodos de tempo e altos custos, avaliações farmacodinâmicas por simulação de  
116 Monte Carlo dos regimes antimicrobianos são aceitas, fazendo parte atualmente dos  
117 estudos clínicos e análises na escolha dos *breakpoints* de sensibilidade [10,12].

118 Este estudo teve como objetivo avaliar o sinergismo e o alcance farmacodinâmico  
119 por simulação de Monte Carlo dos regimes combinados dos antimicrobianos meropenem  
120 com gentamicina que são amplamente disponíveis nos serviços de saúde em todo o  
121 mundo, contra os isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de KPC.

122

## 123 2 - MÉTODOS

### 124 2.1 Agentes antimicrobianos

125 Meropenem em frasco de 1 g (AstraZeneca, Cotia, São Paulo-SP, Brasil) foi  
126 fornecido pelo Hospital da Universidade Estadual de Maringá, e a gentamicina (Sigma-  
127 Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi comprada da LabCompany (Londrina, Paraná, Brasil). A  
128 solução de gentamicina foi preparada em água estéril na concentração de 10 mg/mL e  
129 estocada em geladeira, e as soluções de meropenem foram preparadas no dia dos  
130 experimentos, em água estéril e na mesma concentração.

### 131 2.2 Microrganismos

132 Uma coleção inicial de 34 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC isoladas de  
133 pacientes de várias regiões do Brasil e analisados por PCR seguido por sequenciamento,  
134 confirmou a presença do gene plasmidial *bla*<sub>KPC-2</sub> (primer iniciador, 5' –

135 TCGCTAAACTCGAACAGG – 3’; e primer reverso, 5’ –  
136 TTAGTGCCCGTTGACGCCCAATCC – 3’). A sequência de aminoácidos KPC-2 de cada  
137 isolado foi determinada por uma comparação de sequência contínua de BLAST, e a  
138 relação genética entre os isolados foram tipados por *multilocus sequencing typing* (MLST)  
139 e *pulsed-field gel eletroforesis* (PFGE) [13]. Dessa coleção, foram selecionados 18  
140 isolados de diferentes clones coletados de distintas regiões do Brasil (centro oeste,  
141 nordeste, sudeste e sul) e com variado perfil de sensibilidade para o meropenem (MIC, 1  
142 – 512 mg/L). O isolado de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi utilizado como controle de  
143 qualidade dos experimentos.

#### 144 2.3 Determinação da Concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos.

145 As MICs do meropenem e gentamicina de cada isolado foram avaliadas após duas  
146 subculturas e preparadas a 0.5 McFarland usando um nefelômetro (BD, Sparks, MD,  
147 USA), e a sensibilidade interpretada usando os pontos de corte para *Enterobacteriaceae*  
148 (meropenem, susceptível (S):  $\leq 1$  mg/L; intermediário (I): 2 mg/L; resistente (R):  $\geq 4$  mg/L;  
149 gentamicina, S:  $\leq 4$  mg/L; I: 8 mg/L; R:  $\geq 16$  mg/L), conforme determinado pelo CLSI,  
150 2019. As faixas de concentrações avaliadas para meropenem e gentamicina foram de  
151 0.015 – 2,044 mg/L.

#### 152 2.4 Avaliação da ação sinérgica entre os antimicrobianos

153 Meropenem e gentamicina puros e combinados foram avaliados inicialmente pela  
154 técnica de *checkerboard* usando placas para microtitulação com 96 poços (Inlab, São  
155 Paulo-SP, Brasil). O inóculo de cada isolado foi preparado em caldo Mueller-Hinton com  
156 cátions ajustados na concentração final de 0.5 McFarland CFU/mL, sendo conduzidos em  
157 triplicata. Após serem incubados a 37°C por 16 a 20 horas, foram determinadas a MIC  
158 modal para os antimicrobianos puros ou combinados, e analisadas pelos testes  
159 matemáticos de sinergismo.

#### 160 2.4.1.1 Índice da concentração inibitória fracionada (FICI)

161 O teste de sinergismo FICI utiliza os resultados fornecidos por *checkerboard* e  
162 avalia a combinação de antimicrobianos pela seguinte equação:

163

$$164 \text{ FICI} = \frac{\text{MIC (meropenem combinado)}}{\text{MIC (meropenem puro)}} + \frac{\text{MIC (gentamicina combinada)}}{\text{MIC (gentamicina pura)}}$$

165

166 Onde a classificação do efeito sinérgico da combinação de antimicrobianos de acordo  
167 com os resultados de FICI, foi o seguinte: FICI  $\leq 0.5$ , sinérgico;  $0.5 < \text{FICI} \leq 4$ , indiferente;  
168 FICI  $> 4$ , antagônico [7].

#### 169 2.4.1.2 Índice de aditividade de Loewe

170 O teste pelo índice de aditividade de Loewe está baseado no modelo teórico de  
171 análise de sinergismo por resposta de superfície, e que também utiliza os resultados do  
172 *checkerboard*, avaliando a combinação antimicrobiana pela seguinte equação:

173

$$174 1 = \left( \frac{\text{MIC (meropenem combinado)}}{\text{MIC meropenem puro}} + \frac{\text{MIC (meropenem combinado)}}{\text{MIC gentamicina pura}} \right) + \alpha$$

175

176 Onde  $\alpha$  é o valor do índice de aditividade de Loewe, e as MICs são resultantes do teste de  
177 *checkerboard*. A classificação do efeito sinérgico da combinação dos antimicrobianos  
178 depende do valor resultante de  $\alpha$ , sendo o seguinte:  $\alpha = 0$ , aditivo;  $\alpha > 0$ , sinérgico;  $\alpha < 0$ ,  
179 antagônico [8].

#### 180 2.5 Modelo farmacocinético do meropenem e gentamicina

181 O modelo farmacocinético utilizado para o meropenem foi de um compartimento, o qual  
182 foi avaliado como o melhor modelo para prever a concentração livre do meropenem em  
183 pacientes críticos. A relação creatinina sérica (SCr) e *clearance* (CL) do meropenem foi

184 estimado pela seguinte relação:  $CL (L/h) = 11.1 \times \left(\frac{SCr}{0.7}\right)^{-1}$  com um coeficiente de variação  
185 (CV%) = 52.1%. Os valores médios do volume de distribuição (VD) foi de 33.6 L e da  
186 ligação proteica foi de 2% [14]. O *clearance* de creatinina (CLcr) foi estimado pela  
187 equação de Cockroft & Gault, e as faixas de CLcr e os respectivos regimes do  
188 meropenem infundidos em 0.5 h (inf-0.5h) ou inf-3 h, foram os seguintes: CLcr > 50  
189 mL/min, (1 g q6h; 2 g q8h; 1,5 g q6h); CLcr >25 – 50 mL/min, (1 g q12h; 1 g q6h; 2 g 12h);  
190 CLcr 10 – 25 mL/min, (0.5 q12h; 0.5 g q6h; 1 g q12h); CLcr <10mL/min, (0.5 g q24h; 0.5 g  
191 q12h; 1 g q24h). O modelo utilizado para estimar o  $C_{max}$  dos regimes de gentamicina em  
192 um paciente pesando 70 Kg foi de um compartimento, por meio de equação  
193 farmacocinética padrão no *steady state* [15]. O *clearance* de gentamicina e o volume de  
194 distribuição para pacientes críticos, foram estimados conforme descrito [16]. O protocolo  
195 de Hartford foi utilizado para definir os regimes de gentamicina (7 mg/Kg) em dose única  
196 nos respectivos CLcr (490 mg q24h, CLcr 100 ml/min; 490 mg q36h, CLcr 50 mL/min; 490  
197 mg q48h, CLcr 30 mL/min) [17].

## 198 2.6 Farmacocinética/Farmacodinâmica do meropenem e gentamicina

199 Estudos de PK/PD demonstram que a melhor ação antimicrobiana dos regimes de  
200 meropenem é expressado pelo índice farmacodinâmicos %fT>MIC com valores  $\geq 40\%$ , e  
201 os regimes de gentamicina pelo índice farmacodinâmico  $C_{max}/MIC$  com valores  $\geq 10$  [11].  
202 Para antimicrobianos como o meropenem, classificados como tempo dependente, foram  
203 incluídas análises dos regimes fracionados a cada 6 horas e administrados por inf-3h,  
204 para manter concentrações sobre a MIC por maior período de tempo e fornecer melhores  
205 resultados terapêuticos. A gentamicina, que é um antimicrobiano concentração  
206 dependente com efeito pós antibiótico prolongado, para o qual elevadas  $C_{max}$  fornecem  
207 melhores resultados terapêuticas, foi analisada com regimes de doses únicas inf-0.5h,  
208 com aprazamentos em 24, 36 e 48 horas dependendo do CLcr.

209

## 210 2.7 Análise Farmacodinâmica por Simulação de Monte Carlo.

211 O alcance farmacodinâmico dos regimes de meropenem foi avaliado por simulação  
212 de Monte Carlo realizada em NONMEN v.7.2 (ICON, Ellicott City, MD) e programa  
213 estatístico R 3.5.0, que gerou uma população de 10.000 pacientes adultos críticos virtuais  
214 para cada faixa de função renal (CL<sub>cr</sub>, >50 mL/min; >25 – 50 mL/min; 10 – 25 mL/min;  
215 <10 mL/min), assumindo uma distribuição uniforme [18]. A população gerada apresentou  
216 uma razão de 50/50 de homens e mulheres com proporção adequada entre peso e altura,  
217 conforme descrito previamente [19]. A probabilidade de alcançar o alvo (PTA) para cada  
218 regime de meropenem avaliado foi determinada pela percentagem da população que  
219 alcançou o índice farmacodinâmico (%fT>MIC ≥40%) para cada valor da MIC, sendo  
220 considerado adequados regimes que atingiram PTA ≥90% da população virtual. Os  
221 resultados da simulação foram utilizados para calcular a fração cumulativa de resposta  
222 (CFR) de cada regime do meropenem, resultante da somatória das multiplicação das  
223 frequências dos isolados pelas PTAs de cada regime, sendo considerado melhor regime  
224 aquele que fornece resultado mais próximo de 100% [11]

## 225 3. Resultados:

### 226 3.1.1 Sensibilidade aos agentes antimicrobianos e combinação antimicrobiana.

227 O perfil de sensibilidade dos 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2 para  
228 meropenem e gentamicina e a ação sinérgica dessa combinação são apresentados na  
229 tabela 1. A coleção dos isolados mostraram intervalos de MICs para o meropenem de 1 a  
230 512 mg/L e para gentamicina de 0,25 a 256 mg/L, e os valores das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> para o  
231 meropenem foram 32 e 256 mg/L, respectivamente, e para a gentamicina 0.5 e 256 mg/L,  
232 respectivamente. Quanto aos valores de MICs menores que os *breakpoints* de  
233 sensibilidade, apenas dois (11%) isolados foram sensíveis ao meropenem e 12 (67%)

234 isolados foram sensíveis a gentamicina, de acordo com o CLSI 2019 (meropenem:  $\leq 1$   
235 mg/L; gentamicina:  $\leq 4$  mg/L). O perfil de sensibilidade para a gentamicina mostrou uma  
236 distribuição bimodal e extrema, sendo 12 (66.7%) isolados altamente sensíveis (MIC  $\leq$   
237 1mg/L) e 6 (33.3%) isolados bastante resistentes (MIC  $\geq 128$  mg/mL). Todos os isolados  
238 demonstraram no teste de *checkerboard* redução importante nos valores das MICs,  
239 quando comparadas aos agentes puros, sobretudo para o meropenem. A combinação  
240 reduziu a MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> do meropenem em 1/32 e 1/8, respectivamente, e 1/4 para MIC<sub>50</sub>  
241 e MIC<sub>90</sub> da gentamicina. Para oito (44%) isolados resistentes ao meropenem (MICs  $\geq 4$   
242 mg/L), a combinação resultou em valores de MICs  $\leq$  *breakpoint* sensível de acordo com o  
243 CLSI 2018, chegando a reduzir em até 1/128 nos isolados (KP-10; KP-55). Nos isolados  
244 resistentes para a gentamicina, a MIC desse antimicrobiano foi reduzida pela combinação,  
245 entretanto, não suficiente para torná-los sensíveis.

### 246 3.1.2 Testes de sinergismo

247 Os dois testes matemáticos de sinergismo apresentaram resultados semelhantes,  
248 demonstrando importante sinergismo da combinação de meropenem com gentamicina  
249 contra a coleção de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 avaliada. Todas as análises  
250 realizadas pelo índice de aditividade de Loewe resultaram em sinergismo ( $\alpha < 1$ ), e 16  
251 (89%) isolados expressaram sinergismo pelo critério de FICI, não havendo nenhum  
252 resultado classificado como antagônico.

### 253 3.2.1 Análises Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD) e sinergismo

254 A figura 1 mostra as PTAs das análises por simulação de Monte Carlo alcançadas  
255 no índice farmacodinâmico basal ( $\%fT > MIC: \geq 40\%$ ), pelos regimes de meropenem em  
256 monoterapia ou terapia combinada, em Inf-0.5h ou inf-3h, contra as MICs e frequência  
257 dos isolados nas seguintes faixas de CLcr: CLcr  $> 50$  mL/min, 1g q8h, 1.5g q6h, 2g q8h;  
258 CLcr  $> 25 - 50$  mL/min, 1 g q12h, 1 g q6h, 2 g q12h; CLcr  $10 - 25$ , 0.5 g q12h, 0,5 g q6h, 1

259 g q12h; CLcr <10 mL/min, 0.5 g q24h, 0,5 g q12h, 1 g q24h. A análise farmacodinâmica  
260 comparando os regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada,  
261 evidenciou claramente o resgate do carbapenem pela ação sinérgica da gentamicina. Os  
262 três regimes de meropenem em monoterapia, administrados por inf-0.5h no CLcr > 50  
263 mL/min, alcançaram PTA  $\geq$  90% na MIC de 4mg/L contra apenas 3 (17%) isolados, mas  
264 quando combinados com gentamicina atingiu PTA  $\geq$  90% contra 12 (67%) isolados no  
265 mesmo valor de MIC. A otimização dos regimes do meropenem com doses diárias  
266 maiores e fracionadas com períodos menores em inf-3h, e somadas a ação sinérgica da  
267 gentamicina, mostrou relevante melhora nos resultados. A monoterapia com meropenem  
268 1 g q8h em inf-0.5h para CLcr >50 mL/min alcançou PTA  $\geq$  90% na MIC 4 mg/L contra  
269 apenas 3 (17%) isolados; no entanto, quando ampliada para 1.5 g q6h em inf-3h e  
270 combinada com gentamicina, alcançou PTA  $\geq$  90% na MIC 16 mg/L contra 16 (89%)  
271 isolados. Embora os regimes diários de meropenem tenham sido reduzidos de acordo  
272 com a diminuição do CLcr, foi evidenciado um comportamento inverso no alcance  
273 farmacodinâmico. Meropenem 1 g q8h em inf-0.5h para CLcr > 50 mL/min alcançou PTA  
274  $\geq$  90% na MIC de 4 mg/L, e o regime correspondente de 0.5 g q24h em inf-0,5h para CLcr  
275 < 10 mL/min alcançou PTA  $\geq$  90% na MIC de 16 mg/L.

### 276 3.2.2 Probabilidade de alcançar o alvo (PTA) do meropenem contra MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>

277 A tabela 2 mostra a PTA alcançada no índice farmacodinâmico mínimo (40%  
278  $fT>MIC$ ) dos regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada nas faixas  
279 de Clcr contra as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> da coleção de isolados clínicos *K. pneumoniae* KPC-2.  
280 Em monoterapia, apenas os regimes de meropenem (1 g q24h inf-0.5h; 1g q24h inf-3h)  
281 alcançaram PTA  $\geq$ 90% contra MIC<sub>50</sub> em Clcr <10 mL/min, e todos os regimes de  
282 meropenem resultaram em PTA de valor nulo contra MIC<sub>90</sub>. Entretanto, em terapia  
283 combinada, todos os regimes de meropenem avaliados alcançaram PTA  $\geq$  90% contra a

284 MIC<sub>50</sub>, e os regimes (1 g q24h inf-0.5h; 1g q24h inf-3h) alcançaram PTA ≥90% até contra  
285 MIC<sub>90</sub>.

286 3.2.3 Fração cumulativa de resposta (CFR) do meropenem em monoterapia ou terapia  
287 combinada.

288 A tabela 3 mostra o CFR no índice farmacodinâmico mínimo (40%  $fT > MIC$ )  
289 fornecidos pelos regimes de meropenem administrados em inf-0.5h ou inf-3h, sozinhos ou  
290 combinados com gentamicina para as faixas de CLcr, contra a coleção de isolados  
291 clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2. Em monoterapia, o valor máximo atingido foi 69% pelo  
292 regime de meropenem 2 g q12h inf-3h. Entretanto, quando combinado com gentamicina,  
293 todos os regimes tiveram valores ≥ 80%, sendo que 18 (75%) desses forneceram CFR  
294 ≥90%, dos quais, o melhor regime em dose plena foi 1,5g q6h em ambas infusões com  
295 CFR de 92%.

296 3.2.4 Farmacocinética dos regimes de gentamicina.

297 A tabela 4 mostra os regimes de gentamicina dimensionados conforme  
298 recomendado pelo protocolo de Hartford, administrados em dose única em um paciente  
299 hipotético (simulado em homem branco; pesando 70 Kg, com dados farmacocinéticos de  
300 paciente crítico) para os CLcr (100 mL/min; 50 mL/min; 30 mL/min), e que alcançaram  
301 valores de concentração de vale ≥14mg/L.

302 3.2.5 PK/PD dos regimes de gentamicina

303 A tabela 05 mostra o alcance do índice farmacodinâmico ( $C_{max}/MIC$ ) dos regimes  
304 de gentamicina ajustados para os CLcr, contra a coleção de 18 isolados clínicos de *K.*  
305 *pneumoniae* KPC-2. Todos os regimes de gentamicina alcançaram o valor alvo do índice  
306 farmacodinâmico para os aminoglicosídeos ( $C_{max}/MIC \geq 10$ ) contra os 12 (67%) isolados  
307 classificados como sensíveis para gentamicina ( $MIC \leq 4mg/L$ ) de acordo com o CLSI

308 2019, apresentando em monoterapia uma faixa de  $C_{max}/MIC$  (14 – 68) e em combinação  
309 com o meropenem de  $C_{max}/MIC$  (28 – 567). Entretanto, contra os 6 (33%) isolados  
310 classificados como resistentes ( $MIC \geq 16$  mg/L), nenhum regime de gentamicina alcançou  
311 o valor mínimo desejado do índice farmacodinâmico ( $C_{max}/MIC \geq 10$ ), sendo o maior valor  
312 (2.13) fornecido pelo regime combinado de gentamicina (490 mg q48h) em  $CL_{cr}$  30  
313 mL/min (isolado KP-40)

#### 314 4. DISCUSSÃO:

315 *K. pneumoniae* produtora de KPC continua associada às graves infecções com  
316 altas taxas de morbidade e mortalidade, e sua grande capacidade de disseminação  
317 tornou-a um grave problema mundial de saúde [2]. Diante dos problemas com as terapias  
318 usando polimixinas, usadas comumente contra esses patógenos, como heteroresistência,  
319 farmacocinética incerta e toxicidade, e a restrita disponibilidade dos novos agentes  
320 efetivos, torna-se necessário alternativas terapêuticas rápidas com antimicrobianos  
321 disponíveis, sendo a combinação de meropenem com gentamicina uma alternativa viável  
322 e acessível [3,20]. Embora falharam em mostrar a superioridade da terapia combinada  
323 sobre a monoterapia, fatores como a inclusão de pacientes não apenas infectados por  
324 patógenos multirresistentes e realizados em períodos que ainda não existia a  
325 disseminação das bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenêmicos, podem  
326 justificar a vantagem da monoterapia na época [21].

327 Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que combinou método *in vitro*, testes  
328 matemáticos para avaliar o sinergismo e análises farmacodinâmicas, e demonstrou o  
329 relevante sinergismo da combinação do meropenem com gentamicina e seus regimes de  
330 dose contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2.

331 Os efeitos sinérgicos obtidos *in vitro* demonstraram que a utilização de gentamicina  
332 resgatou o poder do meropenem com a redução nas  $MIC_{50}$  e  $MIC_{90}$  para 1/32 e 1/8,  
333 respectivamente. Outros efeitos de grande impacto nesta associação foi a alteração de

334 categoria (resistente - R para sensível - S), verificada em 8 (44%) isolados, reduzindo as  
335 MICs em até 1/128 (isolados: KP-10; KP-55), e a alta frequência de resultados sinérgicos,  
336 ou seja, 94% das avaliações por FICI e Índice de Aditividade de Loewe, e a ausência de  
337 antagonismo, demonstraram claramente a importância da combinação do meropenem  
338 com gentamicina contra *K. pneumoniae* produtora de KPC-2.

339 A ação sinérgica entre aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos é conhecida e  
340 recomendada há muitos anos, sobretudo contra patógenos multirresistentes [22].  
341 Sinergismo com aminoglicosídeos contra bactérias resistentes aos carbapenêmicos  
342 também são confirmados por outros pesquisadores. Oliva et al. avaliando por  
343 checkerboard sete antimicrobianos em diferentes combinações contra 39 isolados de *K.*  
344 *pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, demonstrou que as combinações com  
345 gentamicina foram as mais sinérgicas e não mostraram antagonismo. Ao compararmos os  
346 dados obtidos por Oliva et al. com aqueles apresentados no presente estudo, verifica-se  
347 que a combinação de meropenem com gentamicina obteve resultados inferiores as  
348 nossas avaliações por FICI [23]. Esta superioridade (89% versus 58.6%) do sinergismo  
349 verificada pode ser devido as características do nosso estudo, onde incluímos apenas  
350 isolados produtores de carbapenemases, menor quantidade de isolados resistentes a  
351 colistina [3 (17%) versus 10 (59%)], menores MIC<sub>50</sub>s e MIC<sub>90</sub>s para o meropenem (32 e  
352 256 mg/L versus 128/512 mg/L) e menor MIC<sub>50</sub> para gentamicina (0.5 mg/L versus 2  
353 mg/L).

354 Os bons resultados *in vitro* para esta associação também já foram reproduzidos em  
355 estudos clínicos. Pacientes com infecção causadas por patógenos produtores de KPC  
356 tratados com terapia combinada apresentaram menor taxa de mortalidade ( $p < 0.05$ )  
357 quando comparado a monoterapia, sendo os aminoglicosídeos parte dessas combinações  
358 [5,6,24-26]. Ao compilarmos esses estudos, analisamos um total de 887 pacientes, sendo  
359 que 443 utilizaram terapia combinada, dos quais 140 receberam aminoglicosídeos, e que

360 95 (67,6%) obtiveram sucesso terapêutico. Em um desses estudos que avaliou o  
361 tratamento de sepse por *K. pneumoniae* produtora de KPC-3, evidenciou-se que a  
362 gentamicina combinada foi fator independente para a redução da mortalidade [26].

363 A menor eficácia dos aminoglicosídeos contra graves infecções e o aparecimento  
364 de resistência durante o tratamento, quando utilizados em monoterapia, classifica essa  
365 classe como coadjuvante, devendo ser utilizados somente em terapia combinada [27]. A  
366 razão dessa melhor ação em combinação está na capacidade dos aminoglicosídeos em  
367 romper a membrana externa do patógeno Gram negativo e facilitar a entrada do outro  
368 agente para alcançar o sítio alvo, e também reduzir a produção das betalactamases,  
369 resultando em maior ação antimicrobiana e supressão de resistência [28,29]. Em nosso  
370 estudo, a redução nas MICs quando meropenem e gentamicina foram combinados, foi  
371 menor para a gentamicina, a qual apresentou diminuição nas MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de 1/8 e 1/2,  
372 respectivamente, e nenhum isolado trocou de categoria R para S à gentamicina  
373 (*breakpoint* sensível: MIC ≤4 mg/L). Nós não possuímos uma resposta conclusiva para a  
374 menor redução das MICs ao aminoglicosídeo, mas as elevadas MICs dos isolados  
375 resistentes a gentamicina (MIC ≥128 mg/L), e também o comportamento coadjuvante  
376 dessa classe na combinação, podem contribuir para explicar a menor redução nas MICs  
377 [27].

378 Otimizar o regime antimicrobiano é explorar ao máximo a capacidade do fármaco  
379 na terapêutica para eliminar o patógeno causador da infecção, e os tipos de  
380 procedimentos para tal dependem da característica de resposta farmacodinâmica dos  
381 antimicrobianos utilizados. Meropenem e gentamicina respondem farmacodinamicamente  
382 pelos seguintes índices e valores: C<sub>max</sub>/MIC, ≥10; %fT>MIC, ≥40% [11]. Nós otimizamos  
383 virtualmente os regimes do meropenem com doses diárias maiores e administrações mais  
384 frequentes, infusão estendida em 3 horas, e ainda incluímos a gentamicina como terapia  
385 combinada. A análise farmacodinâmica mostrou claramente o maior alcance dos regimes

386 otimizados e combinados. O regime de meropenem 1 g q8h inf-0.5 h em monoterapia nos  
387 pacientes com CLcr >50 mL/min alcançou PTA  $\geq 90\%$  na MIC de 4 mg/mL contra apenas  
388 3 (17%) isolados, entretanto, quando ampliado para 1,5 g q6h inf-3 h e combinado com  
389 gentamicina, alcançou PTA  $\geq 90\%$  na MIC de 16 mg/mL atingindo cobertura contra 16  
390 (89%) isolados. Em estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo que avaliou os  
391 regimes da fosfomicina com meropenem contra a mesma coleção de isolados, também  
392 mostrou bons resultados sinérgicos da combinação [13]. Entretanto, comparando os  
393 resultados dos estudos, a gentamicina demonstrou superioridade de ação sinérgica em  
394 resgatar o meropenem, conforme apresentado: redução máxima da MIC (1/128 versus  
395 1/50); redução das MIC<sub>50s</sub> e MIC<sub>90s</sub> (1/32 e 1/8 versus 1/8 e 1/8) respectivamente; quanto  
396 a quantidade de isolados, a transferência de resistentes para sensíveis (8 versus 1); na  
397 função renal normal, alcançados pelos regimes otimizados com PTA  $\geq 90\%$  (12 versus  
398 10), alcançados pelo regime 1.5 g q6h inf-3h (16 versus 14), expressando sinergismo (34  
399 versus 27); apresentaram antagonismo (0 versus 3) [17]. Fosfomicina como gentamicina  
400 também são considerados coadjuvantes, devendo sempre ser administrado em  
401 combinação pela grande capacidade de fazer sinergismo com outros agentes e selecionar  
402 heteroresistência durante o tratamento em monoterapia [30].

403 O maior sucesso terapêutico dos regimes combinados com meropenem mesmo  
404 contra *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, despertou atenção dos  
405 pesquisadores para os limites desse antimicrobiano. Tumbarello et al. comparando a  
406 terapia combinada versus monoterapia em 661 pacientes com infecção por *K.*  
407 *pneumoniae* produtora de KPC, evidenciou que regimes combinados com meropenem  
408 tiveram menor taxa de mortalidade, sobretudo contra MIC  $\leq 8$  mg/mL [5]. Giannella et al.  
409 avaliando 595 pacientes com infecção de corrente sanguínea por *K. pneumoniae*  
410 produtora de KPC com 77% dos isolados apresentando MIC  $\geq 16$  mg/mL, evidenciaram  
411 menor taxa de mortalidade com o uso do regime combinado de meropenem 2 g q8h inf-3h

412 contra MIC  $\geq 16$  mg/mL, e que a combinação do meropenem com gentamicina forneceu o  
413 maior sucesso terapêutico ( $p < 0.001$ ) [31]. Os autores consideraram meropenem um  
414 agente protetor que deve ser usado combinado em doses altas por infusão estendida, e  
415 por meio dos estudos de Del Bono et al. e Pea et al. recomendaram-o em doses maiores  
416 que as preconizadas utilizando monitoramento sérico, até contra MICs  $\leq 64$  mg/L [31-33].  
417 Em nossa coleção, 15 (83%) isolados apresentavam MIC  $\leq 64$  mg/mL para o meropenem,  
418 e quando combinado com gentamicina, todos os isolados apresentaram MICs  $\leq 64$   
419 mg/mL, o que sugere o potencial uso dessa combinação de antimicrobianos contra toda a  
420 coleção avaliada.

421 Embora seja comum isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC apresentarem  
422 sensibilidade aos aminoglicosídeos, outros fatores como toxicidade, dificuldade de  
423 manejar a dose e a indisponibilidade da dosagem sérica nos hospitais, fazem com que  
424 essa classe de antimicrobianos sejam pouco utilizadas na terapêutica. A dose  
425 recomendada da gentamicina para pacientes com função renal normal é de 5 – 7 mg/kg  
426 em dose única diária (se indicada), mantendo  $C_{max}$  de 20 mg/mL e concentração mínima  
427 ( $C_{min}$ )  $< 1$  mg/mL, acompanhada de monitoramento sérico. O protocolo de Hartford é  
428 utilizado amplamente para definir os regimes de doses dos aminoglicosídeos [17]. Pelos  
429 conceitos de PK/PD, regimes de gentamicina devem fornecer  $C_{max}/MIC \geq 10$  para obter  
430 maior sucesso terapêutico, com  $ASC_{24h}$  (70 – 100 mgxh/L) e em dose única diária para  
431 reduzir o risco de nefrotoxicidade [34,35]. Em nossa avaliação, todos os regimes de  
432 gentamicina contra os 12 (66.7%) isolados sensíveis (MIC  $\leq 4$  mg/mL) forneceram  
433  $C_{max}/MIC$  adequados ( $> 10$ ), especialmente quando foram desafiados contra a  
434 combinação, que chegaram alcançar valores de até 567 (isolados: KP-10, KP-12).  
435 Entretanto, os 6 (33.3%) isolados resistentes (MIC  $\geq 16$  mg/mL) forneceram valores de  
436  $C_{max}/MIC$  insuficientes, mesmo em terapia combinada, e a provável razão disso sejam as  
437 elevadas MICs ( $\geq 128$  mg/L), que precisariam ser muito reduzidas pela combinação para

438 atingir um  $C_{max}/MIC$  adequados. Embora os isolados resistentes a gentamicina tenham  
439 produzidos  $C_{max}/MIC$  insuficientes, quando foram expostos a combinação dos  
440 antimicrobianos, expressaram importante redução na MIC do meropenem em até 1/128 e  
441 tornando os valores  $\leq 64$  mg/L. Isso sugeri a inclusão da gentamicina na terapia  
442 combinada, mesmo quando o patógeno for resistente e não havendo uma outra  
443 alternativa. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* também mostraram o sinergismo do  
444 aminoglicosídeo com carbapenêmicos contra patógenos resistentes a ambos  
445 antimicrobianos. Le et al. avaliaram por curva de morte o sinergismo contra isolados de *K.*  
446 *pneumoniae* produtoras de KPC-3 resistentes a amicacina, meropenem, imipenem e  
447 ertapenem (MICs  $\geq 32$  mg/L), e demonstraram que combinações de amicacina com  
448 meropenem ou imipenem foram sinérgicas contra todos os isolados [36]. Hirsch et al.  
449 avaliaram em ratos o sinergismo de amicacina com doripenem contra isolados de *K.*  
450 *pneumoniae* produtoras de KPC resistentes a ambos antimicrobianos, e demonstrou que  
451 a combinação resultou em maior período de sobrevida dos animais [37]. Gonzales-  
452 Padilha et al. em seu estudo clínico, observou que a mortalidade foi menor mesmo  
453 quando os isolados apresentaram sensibilidade intermediária para a gentamicina, e  
454 recomenda sua inclusão na combinação quando faltar opções melhores [26]

455 A insuficiência renal é a toxicidade mais comum causada pelos aminoglicosídeos.  
456 No estudo de Gonzalez-Padilla et al. a taxa de nefrotoxicidade foi mais alta nos pacientes  
457 que utilizaram gentamicina (52,4% versus 17,2%), entretanto, essa toxicidade não  
458 contribuiu para maior mortalidade [26]. Embora, não tenham descrito no estudo se  
459 estimaram a  $ASC_{24h}$  para avaliar a segurança do regime, como também, se houveram  
460 pacientes com insuficiência renal crônica no grupo dos sobreviventes causada pela  
461 gentamicina.

462 A quantidade de isolados não muito grande pode ser uma limitação do nosso  
463 estudo, possibilitando algum viés estatístico nas  $MIC_{50s}$  e  $MIC_{90s}$ , entretanto, a boa

464 variabilidade dos isolados com clonalidades diferentes confirmadas por análises  
465 moleculares e coletados de várias regiões do Brasil, expressam um perfil desses  
466 patógenos no território brasileiro.

467 Concluindo, os bons resultados de sinergismo do meropenem com gentamicina  
468 demonstrados pela pronunciada redução nas MICs de ambos antimicrobianos para todos  
469 os isolados, notavelmente para o carbapenêmico, a grande maioria dos testes resultando  
470 em sinergismo e sem antagonismo, e o maior alcance farmacodinâmico dos regimes  
471 combinados do meropenem em altas doses, fracionadas e por infusão estendida,  
472 mostram que esses antimicrobianos combinados e otimizados podem ser uma alternativa  
473 viável e acessível para combater infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de  
474 KPC.

475

476

477

478

479 Fundos

480 Este estudo não recebeu apoio financeiro específico das agências de fomento à pesquisa  
481 no Brasil, sendo desenvolvido com os materiais e reagentes utilizados na rotina diária do  
482 laboratório de microbiologia básica da Universidade Estadual de Maringá.

483

484 Competência de interesse: nada a declarar

485

486 Aprovação ética: não aplicável

487

488

489

490 **Referências**

- 491 [1] Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in  
492 the United States. 2013; <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report2013/>. Accessed  
493 17 Jan 2019
- 494 [2] World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System.  
495 Manual for Early Implementation. WHO. 2015:1–44.
- 496 [3] Bassetti M, Righi E, Russo A. New Antibiotics for Pneumonia. Clin Chest Med.  
497 2018;39:853-69.
- 498 [4] Dalia Deak, Kevin Outterson, John H. Powers, Aaron S. Kesselheim. Progress in the  
499 Fight Against Multidrug-Resistant Bacteria? A Review of U.S. Food and Drug  
500 Administration–Approved Antibiotics, 2010 –2015. Ann Intern Med. 2016;165(5):363-  
501 72.
- 502 [5] Tumbarello et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*:  
503 differences in therapy and mortality in a multicentre study. J Antimicrob Chemother  
504 2015;70: 2133–2143.
- 505 [6] Medeiros GS, Rigatto MH, Falci DR, Zavascki AP. Combination therapy with polymyxin  
506 B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. Int J  
507 Antimicrob Agents. 2019;53(2):152-157.
- 508 [7] Pillai SK, Moellering R, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. 5th ed.  
509 Philadelphia, PA, EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- 510 [8] Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a  
511 response surface perspective. Pharmacol Ver. 1995;47:331-8.
- 512 [9] Rhodes A1, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R et al. Surviving  
513 Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic  
514 Shock: 2016. Crit Care Med. 2017;45(3):486-552.
- 515 [10] Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of  
516 pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST  
517 approach. Clin Microbiol Infect. 2012;18:37-45.
- 518 [11] Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the  
519 pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agentes. J Infect  
520 Chemother. 2015;21:319-29.
- 521 [12] Bradley JS1, Dudley MN, Drusano GL. Predicting efficacy of antiinfectives with  
522 pharmacodynamics and Monte Carlo simulation. Pediatr Infect Dis J. 2003;22(11):982-  
523 92

- 524 [13] Albiero J, Sy SK, Mazucheli J, Caparroz-Assef SM, Costa BB, Alves JL, et al.  
525 Pharmacodynamic Evaluation of the Potential Clinical Utility of Fosfomycin and  
526 Meropenem in Combination Therapy against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*.  
527 Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(7):4128-39.
- 528 [14] Wong G, Farkas A, Sussman R, Daroczi G, Hope WW, Lipman J, Roberts JA.  
529 Comparison of the accuracy and precision of pharmacokinetic equations to predict free  
530 meropenem concentrations in critically ill patients. Antimicrob Agents Chemother. 2015;  
531 59:1411-7.
- 532 [15] Beringer P, Winter E M. Aminoglycoside Antibiotics. In: Winter EM. Basic Clinical  
533 Pharmacokinetics 5<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. PA. EUA.  
534 2010.
- 535 [16] Rea RS, Capitano B, Bies R, Bigos KL, Smith R, Lee H. Suboptimal aminoglycoside  
536 dosing in critically ill patients. Ther Drug Monit. 2008;30(6):674-81.
- 537 [17] Nicolau DP, Freeman CD, Belliveau PP, Nightingale CH, Ross JW, Quintiliani R.  
538 Experience with a Once-Daily Aminoglycoside Program Administered to 2,184 Adult  
539 Patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(3):650-55)
- 540 [18] 18-R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R  
541 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- 542 [19] Diverse Populations Collaborative Group. Weight-height relationships and body mass  
543 index: some observations from the Diverse Populations Collaboration. Am J Phys  
544 Anthropol. 2005;128:220–229.
- 545 [20] Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-  
546 resistant Gram-negative bacteria. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2013;11(12):1333–  
547 1353.
- 548 [21] Nabarro L. E. B, Veeraraghavan B. Combination therapy for carbapenem-resistant  
549 *Enterobacteriaceae*: increasing evidence, unanswered questions, potential solutions.  
550 Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(12):2307-11).
- 551 [22] Giamarellou H, Zissis NP, Tagari G, Bouzo J. In Vitro Synergistic Activities of  
552 Aminoglycosides and New  $\beta$ -Lactams Against Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*.  
553 Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1984;25(4):534-36).
- 554 [23] Oliva A, Scorzolini L, Cipolla A, Mascellino MT, Cancelli F, Castaldi D, et al. In vitro  
555 evaluation of different antimicrobial combinations against carbapenemase-producing  
556 *Klebsiella pneumoniae*: the activity of the double-carbapenem regimen is related to  
557 meropenem MIC value. J Antimicrob Chemother 2017;72: 1981–84.

- 558 [24] Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al.  
559 Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*:  
560 Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. *Antimicrob Agents Chemother.*  
561 2012;56(4):2108-13.
- 562 [25] Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al.  
563 Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing  
564 *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol*  
565 *Infect.* 2011;17(12):1798-803.
- 566 [26] Gonzalez-Padilla M, Torre-Cisneros J, Rivera-Espinar F, Pontes-Moreno A, López-  
567 Cerero L, Pascual A, et al. Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant  
568 and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(3):905-  
569 13.
- 570 [27] Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant  
571 *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert*  
572 *Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(6):519-526.
- 573 [28] Bulitta JB, Ly NS, Landersdorfer CB, et al. Two mechanisms of killing of *Pseudomonas*  
574 *aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling.  
575 *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2315–2327.
- 576 [29] Yadav R, Bulitta JB, Nation RL, Landersdorfer CB. Optimization of Synergistic  
577 Combination Regimens against Carbapenem- and Aminoglycoside-Resistant Clinical  
578 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates via Mechanism-Based  
579 Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016  
580 27;61(1):1-17).
- 581 [30] Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G et al.  
582 Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clinical Microbiology*  
583 *and Infection.* 2018;24:133-44.
- 584 [31] Giannella M, Treccarichi EM, Giacobbe DR, Giuseppe F, Bassetti M, Bartoloni A, et al.  
585 Effect of combination therapy containing a high dose carbapenem on mortality in  
586 patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Int J*  
587 *Antimicrob Agents.* 2018;51(2):244-248.
- 588 [32] Del Bono V, Giacobbe DR, Marchese A, Parisini A, Fucile C, Coppo E, et al. Meropenem  
589 for treating KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Should we  
590 get to the PK/PD root of the paradox? *Virulence.* 2017;8:66-73.
- 591 [33] Pea F, Della Siega P, Cojutti P, Sartor A, Crapis M, Scarparo C, et al. Might real-time  
592 pharmacokinetic/pharmacodynamic optimisation of high-dose continuous-infusion

593 meropenem improve clinical cure in infections caused by KPC-producing *Klebsiella*  
594 *pneumoniae*? Int j Antimicrob agents. 2017;49:255-8.

595 [34] Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy:  
596 importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. J Infect  
597 Dis. 1987;155(1):93-9.

598 [35] Barclay ML, Duffull SB, Begg EJ, Buttimore RC. Experience of once-daily  
599 aminoglycoside dosing using a target area under the concentration-time curve. Aust N  
600 Z J Med. 1995;25(3):230-5.

601 [36] Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In Vitro Activity of Carbapenems Alone  
602 and in Combination With Amikacin Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. J  
603 Clin Med Res. 2011;3(3):106–110.

604 [37] Hirsch EB, Guo B, Chang KT, Cao H, Ledesma KR, Singh M, et al. Assessment of  
605 antimicrobial combinations for klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing *K.*  
606 *pneumoniae*. J infect Dis. 2013;2017:786-93.

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

**627 Legendas das Figuras**

628 Figura 1: Frequência das MICs dos 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de  
629 KPC-2 nas nos valores de crescents de MICs do meropenem em monoterapia e terapia  
630 combinada e probabilidade de alcançar o alvo ( $40\%fT>MIC$ ) dos regimes de dose do  
631 meropenem nos CLcr: CLcr >50 mL/min (1 g q8h; 1.5 g q6h; 2 g q8hg); CLcr >25 – 50  
632 mL/min (1 g q12h, 1 g q6h, 2 g q12h); CLcr 10 – 25 mL/min (0.5 g q12h, 0.5 g q6h, 1 g  
633 q12h); CLcr <10 mL/min (0.5 g q24h, 0.5 g q12h, 1 g q24h) em pacientes críticos virtuais.

634 Os gráficos a esquerda mostram os regimes de meropenem infundidos em 0.5 horas, e os gráficos a direita  
635 mostram os regimes de meropenem infundidos em 3 horas.

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656 **Figura 1**

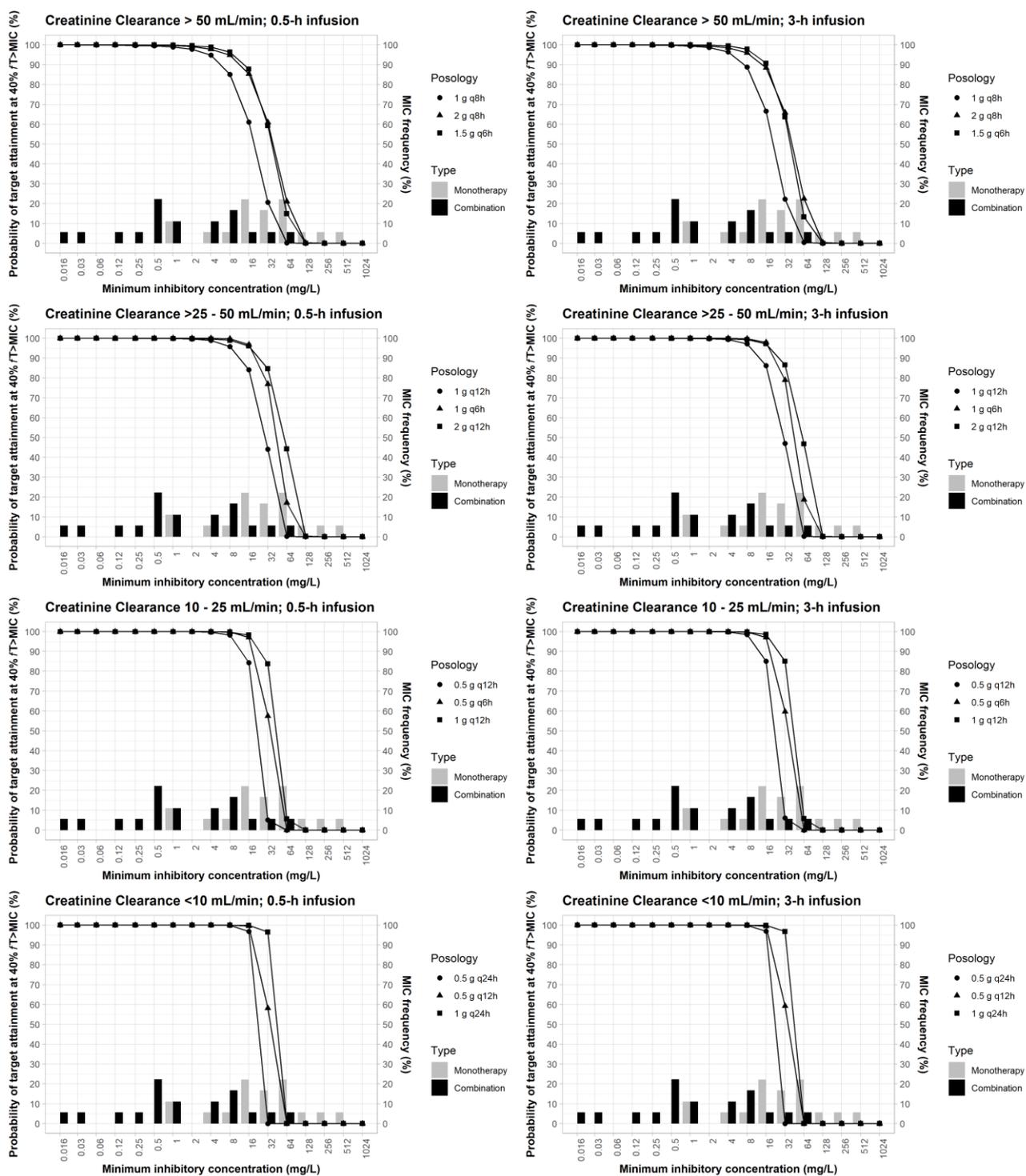


Table 1: Concentração inibitória mínima (MIC) do meropenem e gentamicina sozinhos ou em combinação e avaliação do sinergismo por índice de fração da concentração inibitória (FICI) e índice de aditividade de Loewe contra 18 isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2.

<i>K. pneumoniae</i> isolates	MIC Mero (mg/L)			MIC Genta (mg/L)			Análise de sinergismo			
	Mero	Mero Combinado	Mero redução	Genta	Genta Combinada	Genta redução	FICI	S or I baseado em FICI	Loewe additivity index	S or A baseado no índice de aditividade de Loewe
KP- 3	4	0.12	33	0.25	0.06	4	0.28	S	0.73	S
KP- 4	8	1	8	0.5	0.12	4	0.38	S	0.63	S
KP- 5	1	0.03	33	256	32	8	0.16	S	0.85	S
KP- 8	16	1	16	1	0.12	8	0.19	S	0.82	S
KP- 9	16	0.5	32	0.5	0.12	4	0.28	S	0.72	S
KP- 10	64	0.5	128	0.5	0.03	17	0.07	S	0.93	S
KP- 11	64	8	8	256	64	4	0.38	S	0.50	S
KP- 12	128	4	32	0.5	0.03	17	0.09	S	0.91	S
KP- 15	16	0.5	32	1	0.12	8	0.16	S	0.84	S
KP- 19	64	8	8	0.5	0.06	8	0.25	S	0.76	S
KP- 28	1	0.03	63	0.5	0.12	4	0.27	S	0.72	S
KP- 38	32	4	8	0.5	0.06	8	0.25	S	0.76	S
KP- 39	64	16	4	1	0.5	2	0.75	I	0.25	S
KP- 40	256	64	4	256	8	32	0.28	S	0.72	S
KP- 43	16	8	2	256	64	4	0.75	I	0.25	S
KP- 44	512	32	16	256	32	8	0.18	S	0.81	S
KP- 46	32	0.5	64	0.5	0.12	4	0.27	S	0.73	S
KP- 55	32	0.25	128	128	32	4	0.26	S	0.74	S
MIC <sub>50</sub>	32	1	32	0.5	0.12	4				
MIC <sub>90</sub>	256	32	8	256	64	4				

KP: *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2; Mero: meropenem; Genta: gentamicin; FICI: índice fração da concentração inibitória; S: sinergismo; I, indiferente;

Table 2: Probabilidade de atingir o alvo no índice farmacodinâmico mínimo (40%  $fT > MIC$ ) pelos regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada nas faixas de CLcr contra as MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> dos 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2.

	Meropenem (regimes)	Dose diária total	Probabilidade de atingir o alvo (%)			
			Monoterapia		Terapia combinada	
			MIC <sub>50</sub> (32 mg/L)	MIC <sub>90</sub> (256 mg/L)	MIC <sub>50</sub> (1 mg/L)	MIC <sub>90</sub> (32 mg/L)
CLcr > 50 mL/min	Infusão em 0.5-h					
	1g q8h	3g	20.6	0	99	20.6
	1.5g q6h	6g	59.3	0	99.8	59.3
	2g q8h	6g	60.9	0	99.6	60.9
	Infusão em 3-h					
	1g q8h	3g	22.3	0	99.4	22.3
	1.5g q6h	6g	63.8	0	100	63.8
CLcr > 25 - 50 mL/min	2g q8h	6g	65.8	0	99.8	65.8
	Infusão em 0.5-h					
	1g q12h	2g	44.1	0	99.9	44.1
	1g q6h	4g	76.9	0	100	76.9
	2g q12h	4g	84.7	0	99.9	84.7
	Infusão em 3-h					
	1g q12h	2g	47	0	99.9	47
1g q6h	4g	79	0	100	79	
2g q12h	4g	86.6	0	100	86.6	
CLcr > 10 - 25 mL/min	Infusão em 0.5-h					
	0.5 q12h	1g	5.1	0	100	5.1
	0.5 q6h	2g	57.5	0	100	57.5
	1g q12h	2g	83.8	0	100	83.8
	Infusão em 3-h					
	0.5 q12h	1g	6.1	0	100	6.1
	0.5 q6h	2g	59.7	0	100	59.7
1g q12h	2g	85.1	0	100	85.1	
CLcr < 10 mL/min	Infusão em 0.5-h					
	0.5 q24h	0.5g	0	0	100	0
	0.5 q12h	1g	58.11	0	100	58.11
	1g q24h	1g	96.5	0	100	96.5
	Infusão em 3-h					
	0.5 q24h	0.5g	0	0	100	0
	0.5 q12h	1g	59.2	0	100	59.2
1g q24h	1g	96.8	0	100	96.8	

Table 3: Fração cumulativa de resposta (CFR) no índice farmacocinâmico mínimo (40%  $fT > MIC$ ) dos regimes de meropenem em monoterapia ou terapia combinada nas faixa de CLcr contra os 18 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2.

	Meropenem regimens	Total daily doses	CFR (%)	
			Monotherapy	Combination Therapy
CLcr > 50 mL/min	0.5-h infusion			
	1g q8h	3g	38	85
	1.5g q6h	6g	51	92
	2g q8h	6g	56	91
	3-h infusion			
	1g q8h	3g	40	86
	1.5g q6h	6g	56	92
	2g q8h	6g	59	92
CLcr > 25 - 50 mL/min	0.5-h infusion			
	1g q12h	2g	48	90
	1g q6h	4g	61	94
	2g q12h	4g	68	96
	3-h infusion			
	1g q12h	2g	49	90
	1g q6h	4g	61	94
	2g q12h	4g	69	96
CLcr > 10 - 25 mL/min	0.5-h infusion			
	0.5 q12h	1g	42	88
	0.5 q6h	2g	53	92
	1g q12h	2g	59	94
	3-h infusion			
	0.5 q12h	1g	42	88
	0.5 q6h	2g	54	92
	1g q12h	2g	60	94
CLcr < 10 mL/min	0.5-h infusion			
	0.5 q24h	0.5g	44	89
	0.5 q12h	1g	54	92
	1g q24h	1g	61	94
	3-h infusion			
	0.5 q24h	0.5g	43.5	89
	0.5 q12h	1g	53.9	92
	1g q24h	1g	60.6	94

Table 04: Concentrações máximas alcançadas pelos diferentes regimes de gentamicina nos respectivos clearances de creatinina de acordo com o normograma de Hartford, em paciente grave hipotético (homem, branco, pesando 70 Kg, sem diferença significativa entre peso ideal e total), estimadas por modelo farmacocinético padrão de 1 compartimento.

CLcr (mL/min)	Gentamicina (regimes)	T inf (h)	T C <sub>max</sub> (h)	CR <sub>se</sub> (mg/dL)	GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	CL <sub>genta</sub> (L/h)	VD <sub>genta</sub> (L/70kg)	Ke <sub>genta</sub> (h <sup>-1</sup> )	C <sub>max</sub> (mg/L)
100	490 mg q24h	0.5	0.5	0.88	97.43	2.09	53	0.039	14.4
50	490 mg q36h	0.5	0.5	1.75	44.07	1.37	53	0.026	15.10
30	490 mg q48h	0.5	0.5	2.92	24.41	0.86	53	0.016	17

CLcr: *clearance* de creatinina; T inf: tempo de infusão intravenosa da dose; T C<sub>max</sub>: tempo para alcançar a concentração máxima; CR<sub>se</sub>: concentração sérica de creatinina; GFR: *glomerular filtration rate*; CL<sub>genta</sub>: *clearance* da gentamicina, VD<sub>genta</sub>: volume de distribuição da gentamicina; Ke<sub>genta</sub>: constante de eliminação da gentamicina; C<sub>max</sub>: concentração máxima do regime de gentamicina.

Table 05: Razão da  $C_{max}$  dos regimes de gentamicina (490 mg q24h; 490 mg q36h; 490 mg q48h) nos respectivos CLcr (100 mL/min; 50 mL/min; 30 mL/min) pela MIC ( $C_{max}/MIC$ ) dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 testados contra gentamicina pura ou combinada com meropenem.

Isolates	MIC <sub>pura</sub> (mg/mL)	CLcr (mL/min)			MIC <sub>combi</sub> (mg/mL)	CLcr (mL/min)		
		100 $C_{max}/MIC_{alone}$	50 $C_{max}/MIC_{alone}$	30 $C_{max}/MIC_{alone}$		100 $C_{max}/MIC_{combi}$	50 $C_{max}/MIC_{combi}$	30 $C_{max}/MIC_{combi}$
KP-3	0.25	57.6	60.4	68	0.06	240	251	283
KP-4	0.5	29.8	30.2	34	0.12	120	126	142
KP-5	<b>256</b>	<b>0.056</b>	<b>0.059</b>	<b>0.066</b>	<b>32</b>	<b>0.45</b>	<b>0.47</b>	<b>0.53</b>
KP-8	1	14.4	15.1	17	0.12	120	126	142
KP-9	0.5	29.8	30.2	34	0.12	120	126	142
KP-10	0.5	29.8	30.2	34	0.03	480	503	567
KP-11	<b>256</b>	<b>0.06</b>	<b>0.059</b>	<b>0.066</b>	<b>64</b>	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>	<b>0.27</b>
KP-12	0.5	29.8	30.2	34	0.03	480	503	567
KP-15	1	14.4	15.1	17	0.12	120	126	142
KP-19	0.5	29.8	30.2	34	0.06	240	251	283
KP-28	0.5	29.8	30.2	34	0.12	120	126	142
KP-38	0.5	29.8	30.2	34	0.06	240	251	283
KP-39	1	14.4	15.1	17	0.5	28.8	30.2	34
KP-40	<b>256</b>	<b>0.056</b>	<b>0.059</b>	<b>0.066</b>	<b>8</b>	<b>1.80</b>	<b>1.89</b>	<b>2.13</b>
KP-43	<b>256</b>	<b>0.056</b>	<b>0.059</b>	<b>0.066</b>	<b>64</b>	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>	<b>0.27</b>
KP-44	<b>256</b>	<b>0.056</b>	<b>0.059</b>	<b>0.066</b>	<b>32</b>	<b>0.45</b>	<b>0.47</b>	<b>0.53</b>
KP-46	0.5	29.8	30.2	34	0.12	120	126	142
KP-55	<b>128</b>	<b>0.11</b>	<b>0.12</b>	<b>0.13</b>	<b>32</b>	<b>0.45</b>	<b>0.47</b>	<b>0.53</b>

MIC<sub>pura</sub>: MIC apenas da gentamicina; MIC<sub>combi</sub>: MIC da gentamicina combinada com meropenem; CLcr: *clearance* de creatinina,  $C_{max}$ : concentração máxima alcançada pelo regime de gentamicina; em negrito, valores de  $C_{max}/MIC$  insuficientes (<10)

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

As reduções nas MICs causadas pelas combinações de meropenem com fosfomicina contra isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR produtora e não produtora de Metallo- $\beta$ -lactamase, e de meropenem com gentamicina contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2, que resultaram grande parte dos testes em sinergismo e em valores de MICs alcançáveis pelos regimes combinados e otimizados, demonstram a viabilidade potencial dessas associações de antimicrobianos para tratar pacientes com infecções causadas por esses patógenos;

Os bons resultados da maioria dos testes de sinergismo e as reduções nos valores das MICs para concentrações alcançadas pelos regimes em altas doses e otimizados podem justificar os melhores resultados clínicos dos estudos epidemiológicos com tratamentos combinados contra esses patógenos, comparado a monoterapia.

A adição da análise farmacodinâmica comparando as terapias combinada e monoterapia demonstradas em gráficos de PTA com sinergismo, deixou evidente o maior alcance farmacodinâmico dos regimes ampliados, otimizados e combinados.

A demonstração da potencialidade dos regimes combinados e otimizados com antimicrobianos de baixo custo, amplamente conhecidos e disponíveis aos serviços de saúde no mundo, como meropenem, gentamicina e fosfomicina, capazes de combater patógenos tão temidos como *P. aeruginosa* MDR produtora e não produtora de Metallo- $\beta$ -lactamase e *K. pneumoniae* KPC-2, vem de encontro aos alertas do CDC e WHO de que precisamos de alternativas rápidas e acessíveis para tratar infecções causadas por esses patógenos;

Mostrar o relevante sinergismo do meropenem com fosfomicina contra *P. aeruginosa* MDR produtora e não produtora de Metallo- $\beta$ -lactamase, e meropenem com gentamicina contra *K. pneumoniae* KPC-2 e o alcance farmacodinâmico dessas combinações em posologias atualmente liberadas, fornece dados para estudos mais complexos tanto *in vivo* como clínicos.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Desenvolver estudos em animais infectados com isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR produtora ou não produtora de Metallo- $\beta$ -lactamase e utilizar a combinação de meropenem com fosfomicina. Usar também animais infectados com isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC-2 e utilizar a combinação de meropenem com gentamicina para tratá-los, assim avaliando a ação sinérgica dos antimicrobianos em ambiente dinâmico onde existe alterações farmacocinéticas e fisiopatológicas.

Os regimes utilizados nesse estudo foram de posologias liberadas para o uso terapêutico. Desenvolver estudos clínicos em pacientes com infecção causadas por *P. aeruginosa* MDR produtora ou não produtora de Metallo- $\beta$ -lactamase e *K. pneumoniae* KPC-2 usando a combinação em altas doses e otimizadas de meropenem com fosfomicina e meropenem com gentamicina, contra os respectivos patógenos, parece ser uma alternativa promissora para avaliar resultados clínicos e custos de tratamento.

