

# EFEITO ANTIMICROBIANO *in vitro* DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMIXINA B E CEFTAZIDIMA EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Cecília Saori Mitsugui\*  
Maria Cristina Bronharo Tognim\*\*  
Florister Elaine Carrara-Marrone\*\*\*  
Lourdes Botelho Garcia\*\*\*\*

## RESUMO

A associação de antibióticos é uma alternativa para tratar doenças infecciosas de etiologia polimicrobiana ou causadas por bactérias multirresistentes, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*. No presente estudo, investigamos a atividade antimicrobiana "in vitro" da combinação de polimixina B e ceftazidima, em 20 amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Inicialmente, a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo para cada uma das amostras selecionadas. Posteriormente, com base nos valores das CIMs, o efeito antimicrobiano da combinação da polimixina B e ceftazidima foi avaliado por meio do método de "checkerboard". Os resultados demonstraram que todas as amostras de *P. aeruginosa* estudadas foram sensíveis à polimixina B, com CIMs variando entre 1 e 2 µg/ml. Em relação à ceftazidima, as CIMs variaram de 2 a 8 µg/ml, em nove amostras sensíveis, e de 16 a 1.024 µg/ml, em 11 amostras, resistentes a esse antibiótico. Para todas amostras testadas, o efeito antimicrobiano da combinação de polimixina B e ceftazidima foi indiferente, sugerindo que esta associação, quando utilizada na forma de terapia combinada *in vivo*, pode não apresentar atividade superior àquela obtida pela monoterapia.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*. Polimixina B. Ceftazidima.

## INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose que, nos últimos anos, têm ocupado lugar de destaque entre os patógenos hospitalares por causarem pneumonias associadas à ventilação mecânica, bacteremias, endocardites, meningites, infecções do trato urinário e da pele, sobretudo em pacientes internados em unidades de terapia intensiva ou em terapia imunossupressora<sup>(1)</sup>.

O uso indiscriminado de antimicrobianos, no tratamento das infecções adquiridas em hospitais, i.e., infecções hospitalares, tem contribuído para o surgimento de clones multirresistentes de pseudomonas e constitui um grave problema nos hospitais em todo o mundo<sup>(2)</sup>. Na América Latina, particularmente no Brasil, este microrganismo representa um dos agentes mais frequentemente associados à

etiologia das infecções hospitalares, especialmente as do trato respiratório<sup>(3,4)</sup>.

A relevância clínica de *P. aeruginosa* aumenta de acordo com a dificuldade crescente do tratamento das infecções causadas por essa bactéria pela sua resistência intrínseca a vários antibióticos, como a maioria dos β-lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos<sup>(5,6)</sup>. Por muito tempo, as cefalosporinas de amplo espectro foram os antimicrobianos de primeira escolha no tratamento das doenças causadas por bactérias Gram-negativas. Entretanto, a emergência da produção de enzimas como as β-lactamases do tipo ampC e de espectro estendido (ESBL) limitou o uso de cefalosporinas para esses microrganismos que, posteriormente, foram substituídas pelos carbapenêmicos, classe de antibióticos β-lactâmicos resistente à hidrólise pela maioria das β-lactamases bacterianas<sup>(7,8)</sup>. Embora os

\* Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário Regional de Maringá. Mestranda do Curso de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (UEM).

\*\* Farmacêutica Bioquímica. Doutora. Docente do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

\*\*\* Farmacêutica Bioquímica. Mestre. Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

\*\*\*\* Farmacêutica Bioquímica. Doutora. Docente do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

carbapenêmicos representem os agentes de escolha na terapia antimicrobiana de infecções hospitalares graves causadas por bactérias Gram-negativas, é freqüente, nos hospitais brasileiros, o isolamento de amostras clínicas, especialmente *P. aeruginosa*, resistentes a essas drogas<sup>(8)</sup>. Nestas situações, as polimixinas têm sido a única opção terapêutica, embora, alguns estudos já tenham mostrado a existência de cepas de *P. aeruginosa* com sensibilidade reduzida a este agente<sup>(9,10)</sup>. Atualmente, a atividade antimicrobiana da combinação de diferentes antibióticos é estudada “in vitro” e “in vivo”, com intuito de propiciar nova alternativa terapêutica para infecções causadas por microrganismos multirresistentes. O efeito sinérgico da polimixina B, quando associada à rifampicina, foi observado em alguns estudos “in vitro”, porém a eficácia da combinação das polimixinas com antibióticos de outras classes ainda é assunto pouco investigado<sup>(9,11)</sup>.

## OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da combinação “in vitro” da polimixina B com a ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

## METODOLOGIA

### Amostras bacterianas

Para a realização deste estudo foram investigadas 20 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de pacientes internados no Hospital da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Pr) no período de março de 2003 a março de 2005. O critério utilizado para a seleção das amostras foi a sensibilidade à polimixina B, associada à sensibilidade à ceftazidima (nove amostras) ou à resistência à ceftazidima (11 amostras). A amostra de coleção *P. aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection, Bethesda, MD, USA) foi utilizada como controle de qualidade nos experimentos. Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram estocadas em ágar tripticaseína soja (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) à temperatura ambiente, congeladas em caldo Müller-Hinton (Difco), adicionado de 30% de

glicerol (Merck, Darmstadt, Germany) e conservadas em “freezer” a -20°C.

### Agentes antimicrobianos

Dois antibióticos foram utilizados no presente estudo: ceftazidima (EMS Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia, São Paulo, Brasil) e polimixina B (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

### Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) da ceftazidima e da polimixina B foi determinada pelo método da microdiluição, utilizando-se o caldo Mueller-Hinton (Difco) com cátions-ajustados, conforme descrito no manual do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*<sup>(12)</sup> e interpretado, segundo manual do *Clinical and Laboratory Standards Institution*<sup>(13)</sup>. As concentrações de ceftazidima e polimixina B testadas foram de 0,5 a 2.048 µg/ml e de 0,015 a 32 µg/ml, respectivamente.

### Avaliação da atividade antimicrobiana das combinações de antibióticos

O teste de combinação das duas drogas foi realizado pelo método do “checkerboard”<sup>(14)</sup>, utilizando placas de microdiluição com 96 poços onde foram preparadas, em caldo Mueller-Hinton, diferentes concentrações (múltiplas ou frações da CIM) de ceftazidima e polimixina B isoladamente e da associação. O inóculo de cada amostra foi preparado em caldo Mueller-Hinton e adicionado na concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Após o período de incubação, a 37°C, por 16 a 20 horas, as CIMs de cada antibiótico e das combinações foram determinadas e utilizadas para o cálculo do índice da fração inibitória (IFI), por meio da seguinte fórmula:  $IFI_{CTZ} = (CIM_{CTZ+PB} / CIM_{CTZ})$  ou  $IFI_{PB} = (CIM_{PB+CTZ} / CIM_{PB})$ , em que: CIM CTZ+PB representa a CIM da ceftazidima quando associada à polimixina B. CIM PB+CTZ representa a CIM da polimixina B quando associada à ceftazidima. CIM CTZ e CIM PB representam a CIM de ceftazidima e polimixina B respectivamente, quando testadas isoladamente. A somatória dos IFIs ( $\Sigma IFI = IFI_{CTZ} + IFI_{PB}$ ) foi utilizada para a classificação dos efeitos, de acordo com os

critérios propostos por Song et al<sup>(15)</sup>: sinergismo ( $\Sigma IFI \leq 0,5$ ), sinergismo parcial ( $\Sigma IFI > 0,5 < 1$ ), aditivo ( $\Sigma IFI = 1$ ), indiferente ( $\Sigma IFI > 1 < 4$ ) e antagonismo ( $\Sigma IFI \geq 4$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das CIMs da polimixina B, para as 20 amostras de *P. aeruginosa* estudadas, variaram de 1 a 2  $\mu\text{g/ml}$ . Nas nove amostras sensíveis à ceftazidima, as CIMs variaram de 2 a 8  $\mu\text{g/ml}$  e nas amostras resistentes a esse antibiótico, as CIMs oscilaram de 16 a 1.024  $\mu\text{g/ml}$ .

Nos testes de combinação, os valores das CIMs da ceftazidima e da polimixina B, quando comparados aos resultados obtidos nos testes das drogas isoladamente, permaneceram inalterados em 16 amostras (80%). Duas amostras (10%) apresentaram resultados inferiores para polimixina B ( $IFI_{PB}=0,5$ ), e duas amostras (10%) apresentaram resultados superiores para ceftazidima ( $IFI_{CTZ}=2$ ). Independente dos índices obtidos para ceftazidima e polimixina B, o efeito antimicrobiano da combinação desses antibióticos foi indiferente para todas as amostras testadas com  $\Sigma IFI > 1 < 4$  (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados das CIMs da ceftazidima e polimixina B e dos efeitos obtidos pela combinação “in vitro” desses antibióticos em amostras clínicas e de coleção de *Pseudomonas aeruginosa*. Londrina-Pr, 2003-2005.

Amostras	CIM <sup>2</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )		IFI <sup>5</sup>		$\Sigma IFI$ <sup>6</sup>	Efeito
	CTZ <sup>3</sup>	PB <sup>4</sup>	CTZ	PB		
ATCC 27853 <sup>1</sup>	2	1	1	1	2	IND <sup>7</sup>
5	64	2	1	1	2	IND
11	128	2	1	1	2	IND
15	2	2	1	1	2	IND
28	2	1	1	2	3	IND
29	4	1	1	1	2	IND
30	256	2	1	1	2	IND
31	1.024	1	1	1	2	IND
67	4	2	1	0,5	1,5	IND
72	2	2	1	1	2	IND
128	16	2	1	1	2	IND
176	2	2	1	1	2	IND
194	2	1	1	1	2	IND
212	1.024	1	1	1	2	IND
220	2	2	1	1	2	IND
235	2	2	1	1	2	IND
283	128	2	1	1	2	IND
288	1.024	1	1	2	3	IND
333	1.024	2	1	1	2	IND
413	1.024	1	1	0,5	1,5	IND
424	1.024	2	1	1	2	IND

<sup>1</sup>Amostra-padrão de *Pseudomonas aeruginosa*. <sup>2</sup>Concentração inibitória mínima. <sup>3</sup>Ceftazidima. <sup>4</sup>Polimixina B. <sup>5</sup>Índice da fração inibitória. <sup>6</sup>Somatória dos índices de frações inibitórias. <sup>7</sup>Indiferente.

Desde 1980, após o lançamento dos carbapenêmicos (imipenem), nenhuma nova classe de antibióticos foi introduzida para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes como, por exemplo, *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa*. Infelizmente, não há expectativas de novos lançamentos comerciais de antibióticos

para estes microrganismos num futuro próximo<sup>(1,8)</sup>. Por esse motivo, estudos adicionais quanto ao uso racional dos antimicrobianos já existentes como, por exemplo, as polimixinas, devem ser implementados<sup>(16)</sup>.

As polimixinas ressurgiram em consequência da alta mortalidade causada por bacilos Gram-negativos multirresistentes, em especial em

unidades de terapia intensiva e da pouca disponibilidade de opções terapêuticas. Apesar da toxicidade das polimixinas, vários estudos respaldam o uso clínico destes antibióticos, especialmente da colistina<sup>(9,11,16)</sup>.

Em combinação com outros antibióticos, as polimixinas podem atuar aumentando a permeabilidade da membrana externa da parede celular bacteriana e permitir a passagem da outra droga para o interior da célula, executando, assim, efeito antimicrobiano combinado<sup>(11,17)</sup>. Estudos “*in vitro*” têm demonstrado sinergismo entre polimixina B e azitromicina, rifampicina ou imipenem contra *Acinetobacter baumannii*. Efeitos sinérgicos também foram descritos em estudos realizados com polimixina B associada à azitromicina, e colistina associada à rifampicina contra *P. aeruginosa*<sup>(10,11)</sup>.

A ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração, comumente utilizada em hospitais, tem apresentado efeito sinérgico “*in vitro*”, quando combinada a alguns antibióticos. Ao ser associada com levofloxacina e testada em pacientes com pneumonias nosocomiais causadas por diferentes bactérias, apresentou melhor resultado no controle clínico e microbiológico da infecção quando o patógeno isolado era *P. aeruginosa*, graças ao sinergismo entre cefalosporinas e fluoroquinolonas<sup>(18)</sup>. Com a combinação entre azitromicina com ceftazidima e quinolonas, Timurkaynak<sup>(17)</sup> obteve efeitos sinérgicos em amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Gunderson *et al*<sup>(19)</sup>, ao comparar o efeito da combinação de

colistina e ceftazidima com colistina e ciprofloxacina em um modelo farmacodinâmico, obtiveram resultado sinérgico na primeira combinação.

Nossos resultados demonstraram que não houve sinergismo na associação de polimixina B e ceftazidima, nas amostras de *P. aeruginosa* testadas. A sensibilidade e a resistência à ceftazidima não influenciou o comportamento das amostras frente à combinação deste agente com a polimixina B.

## CONCLUSÃO

A combinação de antibióticos é realizada com base na susceptibilidade microbiana, pois a potencialização do efeito antimicrobiano é usualmente obtida quando o microrganismo é susceptível a cada um dos antibióticos associados. Entretanto, diferentes estudos têm demonstrado o aumento deste efeito, quando combinações de antibióticos são adicionadas, tanto em culturas de amostras bacterianas sensíveis quanto em amostras resistentes aos agentes testados. Em nosso estudo, ao contrário do esperado, o efeito antimicrobiano dos antibióticos testados não foi potencializado pela associação dos antimicrobianos. Essa combinação não apresentou sinergismo e, sim, indiferença, sugerindo que a combinação de ceftazidima e polimixina B, quando utilizada *in vivo*, pode não apresentar atividade superior àquela obtida pela monoterapia, especialmente em relação à polimixina B.

---

### THE *in vitro* ANTIMICROBIAL EFFECT OF POLYMYXIN B ASSOCIATED WITH CEFTAZIDIME IN *Pseudomonas aeruginosa* CLINICAL ISOLATES

#### ABSTRACT

The antibiotics association is an alternative to treat infectious diseases, either caused by polymicrobial etiology or those caused by multidrug-resistant bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, the *in vitro* antimicrobial activity of the polymyxin B and ceftazidime combination was investigated in 20 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) of those agents was determined by using the broth microdilution technique for each of the selected strains. Afterwards, based on MIC values, the antimicrobial effect of the polymyxin B and ceftazidime combination was evaluated by making use of “checkerboard” method. The results demonstrated that all *P. aeruginosa* strains studied were sensitive to polymyxin B, with MICs varying from 1 to 2 µg/ml. In relation to ceftazidime, MICs varied from 2 to 8 µg/ml in nine sensitive strains, and from 16 to 1.024 µg/ml in 11 strains resistant to that antibiotic. For all strains tested, the antimicrobial effect of the polymyxin B and ceftazidime combination was indifferent, thus suggesting that such an association, when used as a combined *in vivo* therapy, sometimes does not present any activity superior to the one obtained with monotherapy.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*. Polymyxin B. Ceftazidime.

---

## EFEECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMIXINA B Y CEFTAZIDIMA EN MUESTRAS CLÍNICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

### RESUMEN

La asociación de antibióticos es una alternativa para tratar enfermedades infecciosas de etiología polimicrobiana o causadas por bacterias multiresistentes, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*. En el presente estudio, investigamos la actividad antimicrobiana *in vitro* de la combinación de polimixina B y ceftazidima en 20 muestras clínicas de *P. aeruginosa*. Inicialmente, la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los agentes fue determinada por la técnica de microdilución en caldo para cada una de las muestras seleccionadas. Posteriormente, con base en los valores de las CIMs, el efecto antimicrobiano de la combinación de la polimixina B y ceftazidima fue evaluado a través del método de "checkerboard". Los resultados demostraron que todas las muestras de *P. aeruginosa* estudiadas fueron sensibles a la polimixina B, con CIMs variando entre 1 y 2 µg/ml. En relación con la ceftazidima, las CIMs variaron de 2 a 8 µg/ml en nueve muestras sensibles, y de 16 a 1.024 µg/ml en 11 muestras resistentes a ese antibiótico. Para todas las muestras testadas, el efecto antimicrobiano de la combinación de polimixina B y ceftazidima fue indiferente, sugiriendo que esta asociación, cuando utilizada en la forma de terapia combinada *in vivo*, puede no presentar actividad superior a aquella obtenida por la monoterapia.

**Palabras Clave:** *Pseudomonas aeruginosa*. Polimixina B. Ceftazidima.

### REFERÊNCIAS

1. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18: 306-13.
2. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Vilar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1999;27:1794-9.
3. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*. 1999;32 Suppl.:S104-13.
4. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*. 2001;5:200-14.
5. Carsenti-Etesse H, Cavallo JD, Roger PM, Ziha-Zarifi I, Plesiat P, Garrabe E, et al. Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on the *in vitro* development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:144-51.
6. Soares MCST. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isolados em hospitais da cidade de Niterói-RJ. [tese]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005.
7. Gales AC, Mendes RE, Rodrigues J, Sader HS. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38:13-20.
8. Sader HS. Polimixinas: menos tóxicas e mais necessárias que imaginávamos. *Prática Hospitalar*. 2006;46:216-20.
9. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-41.
10. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:954-7.
11. Arnold TM, Forrest GN, Messmer KJ. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64:819-26.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6. Wayne, PA: NCCLS; 2003.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007.
14. Eliopoulos GM, Moellering Jr. RC. Antimicrobial Combinations. In Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996; p. 432-92.

15. Song W, Woo HJ, Kim JS, Lee KM. In vitro activity of  $\beta$ -lactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2003;21:8-12.
16. Li J, Nation RI, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2006;6:589-601.
17. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:224-8.
18. Bassetti M, Righi E, Rosso R, Mannelli S, Di Biagio A, Fasce R, et al. Efficacy of the combination of levofloxacin plus ceftazidime in the treatment of hospital-acquired pneumonia in the Intensive Care Unit. Int J Antimicrob Agents. 2006;28:582-5.
19. Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB, Fromm TL, Reed MD, Rotschafer JC. Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47: 905-9.

---

**Endereço para correspondência:** Dra. Lourdes Botelho Garcia. Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Análises Clínicas. Avenida Colombo, 5790. CEP: 87020-900. Maringá-PR. E-mail: lbgarcia@uem.br

Recebido: 30/09/2007  
Aprovado: 30/03/2008