

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

**Συνδυαστική θεραπεία έναντι
πολυανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae*
που παράγουν καρβαπενεμάσες σε ένα
in vitro δυναμικό μοντέλο
φαρμακοκινητικής προσομοίωσης***

ΣΚΟΠΟΣ Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CP-Kp) σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνητότητας, ειδικά σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Με τα ποσοστά αντοχής στις καρβαπενεμές να αυξάνονται και καθώς δεν υπάρχουν καινούργια δραστικά αντιβακτηριακά φάρμακα, η συνδυαστική αντιμικροβιακή θεραπεία χρησιμοποιείται συχνά εναντίον CP-Kp. Στην παρούσα μελέτη προσομοιώθηκε η φαρμακοκινητική της μεροπενέμης, της κολιστίνης και της τιγκεκυκλίνης ως μονοθεραπεία και σε συνδυασμό σε ένα *in vitro* φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο και κατόπιν μελετήθηκε η δράση τους έναντι στελεχών CP-Kp με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής και μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στη μεροπενέμη. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Σχήματα τιγκεκυκλίνης, κολιστίνης και μεροπενέμης μόνα τους, σε διπλό και τριπλό συνδυασμό μελετήθηκαν έναντι ενός στελέχους άγριου τύπου και έξι στελεχών CP-Kp (δύο στελέχη παρήγαγαν καρβαπενεμάση VIM, ένα KPC, ένα NDM, ένα KPC+VIM και ένα KPC+VIM+SHV-5) με MIC στη μεροπενέμη 0,06 και 16–512 mg/L, αντίστοιχα. Προσομοιώθηκε το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου στο ανθρώπινο πλάσμα των δοσολογικών σχημάτων 100 mg τιγκεκυκλίνης q12, 4,5 MU κολιστίνης q12 και 1 g μεροπενέμης q8 ως ωριαίες εγχύσεις για 48 ώρες. Τα επίπεδα των φαρμάκων προσδιορίστηκαν με μικροβιολογική δοκιμασία. Το βακτηριακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL) μετρήθηκε με ποσοτικές καλλιέργειες και η μείωση από το αρχικό εναιώρημα 10^7 CFU/mL υπολογίστηκε σε 48 ώρες. Η σχέση μεταξύ βακτηριοκτόνου δράσης ($>3 \log_{10}$ CFU/mL μείωση) και MIC μεροπενέμης των σχημάτων μονοθεραπείας και συνδυαστικής θεραπείας υπολογίστηκε με βάση το μοντέλο Emax. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Το στέλεχος άγριου τύπου θανατώθηκε με τη μονοθεραπεία της μεροπενέμης, καθώς και με τα συνδυαστικά δοσολογικά σχήματα. Έναντι των στελεχών CP-Kp, η μεροπενέμη δεν ήταν βακτηριοκτόνος ενώ η δράση της ενισχύθηκε από την τιγκεκυκλίνη, την κολιστίνη και τον συνδυασμό τιγκεκυκλίνης+κολιστίνης. Η τιγκεκυκλίνη και η κολιστίνη μόνες τους και σε συνδυασμό δεν ήταν δραστικές. Η μέγιστη τιμή MIC μεροπενέμης όπου εμφανίστηκε βακτηριοκτόνος δράση έναντι CP-Kp ήταν 1 mg/L, 8 mg/L, 128 mg/L και 256 mg/L για τη μονοθεραπεία μεροπενέμης, τους διπλούς συνδυασμούς μεροπενέμης+τιγκεκυκλίνης και μεροπενέμης+κολιστίνης και τον τριπλό συνδυασμό μεροπενέμης+τιγκεκυκλίνης+κολιστίνης, αντίστοιχα. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η διπλή συνδυαστική θεραπεία (μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη και μεροπενέμη+κολιστίνη) και η τριπλή συνδυαστική θεραπεία (μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη) ήταν αποτελεσματικές έναντι πολυανθεκτικών CP-Kp στελεχών με MIC ≥ 8 mg/L. Η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής αγωγής και να αποτελέσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία πολυανθεκτικών λοιμώξεων.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2018, 35(2):198–206
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2018, 35(2):198–206

Μ. Τσάλα,¹
Σ. Βουρλή,¹
Γ. Δαϊκος,²
Α. Τσακρής,³
Σ. Πουρνάρας,¹
Ι. Μελετιάδης¹

¹Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

³Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Combination therapy
against multidrug resistant
carbapenemase producing
Klebsiella pneumoniae in
an *in vitro* pharmacokinetic-
pharmacodynamic model

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Klebsiella pneumoniae
Κολιστίνη
Μεροπενέμη
Συνδυαστική Θεραπεία
Τιγκεκυκλίνη

Υποβλήθηκε 25.5.2017
Εγκρίθηκε 31.5.2017

* Β΄ Βραβείο του Επάθλου «Σωτήρης Παπασταμάτης» στο πλαίσιο του 43ου Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου από την Ιατρική Εταιρεία Αθηνών (Αθήνα, 10–13 Μαΐου 2017)

Η *Klebsiella pneumoniae* ευθύνεται για σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως βακτηριαιμία, πνευμονία συνδεδεμένη με αναπνευστήρα κ.ά.¹ Τις προηγούμενες δεκαετίες, στα ελληνικά νοσοκομεία είχαν επικρατήσει πολυανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* με αντοχή στις κεφαλοσπορίνες, στις αμινογλυκοσίδες και στις κινολόνες, αφήνοντας ως θεραπεία πρώτης εκλογής τις καρβαπενέμες. Ωστόσο, η εμφάνιση και επικράτηση στελεχών ανθεκτικών και στις καρβαπενέμες εξ αιτίας της παραγωγής καρβαπενεμασών τα τελευταία χρόνια² αποτελεί ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα καθώς τα στελέχη αυτά προκαλούν λοιμώξεις που σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνητότητας, ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.^{3,4}

Οι καρβαπενεμάσες είναι β-λακταμάσες με ευρύ φάσμα υδρόλυσης, το οποίο περιλαμβάνει τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες, και παρέχουν στα στελέχη που τις παράγουν μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στα παραπάνω αντιβιοτικά. Με βάση τη δομή τους κατατάσσονται στις τάξεις A, B και D κατά Ambler, με χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους κάθε τάξης τα ένζυμα τύπου KPC, VIM ή NDM και OXA, αντίστοιχα. Οι καρβαπενεμάσες των τάξεων A και D έχουν σερίνη στο ενεργό κέντρο τους, ενώ αυτές της τάξης B είναι μεταλλο-ένζυμα και η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία ψευδαργύρου.⁵ Ένα από τα χαρακτηριστικά της *K. pneumoniae* είναι η ικανότητά της να αποκτά αντοχή έναντι διαφορετικών κατηγοριών αντιβιοτικών, περιλαμβανομένων των καρβαπενεμών.⁶ Είναι επομένως επιτακτική η ανάγκη για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, τόσο για την ενίσχυση της βακτηριοκτόνου δράσης όσο και στην πρόληψη ή στην επιβράδυνση της εμφάνισης της ανθεκτικότητας.^{7,8}

Οι θεραπευτικές επιλογές για τις λοιμώξεις οι οποίες προκαλούνται από τα βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες συνήθως περιορίζονται σε κολιστίνη, γενταμικίνη ή και τιγκεκυκλίνη,⁹ αλλά το βέλτιστο δοσολογικό σχήμα δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αγωγή με τιγκεκυκλίνη ή με μια αμινογλυκοσίδα γενικά συνδέεται με θετικά αποτελέσματα,^{10,11} καθώς και ότι οι συνδυασμοί καρβαπενεμών με κολιστίνη ή τιγκεκυκλίνη μπορεί να λειτουργήσουν συνεργικά.^{12,13} Επί πλέον, μελέτες δείχνουν ότι έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από CP-Kr οι συνδυαστικές θεραπείες μπορεί να είναι περισσότερο αποτελεσματικές από τις μονοθεραπείες.^{4,14,15}

Ωστόσο, είναι άγνωστο ποιος συνδυασμός είναι ο πλέον δραστικός έναντι στελεχών CP-Kr, αν ο μηχανισμός δράσης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας και αν η συνδυαστική θεραπεία είναι εξ ίσου αποτελεσματική για στελέχη CP-Kr με υψηλές τιμές MIC στη μεροπενέμη. Οι περισσότερες κλινικές μελέτες είναι

αναδρομικές, όπου διαφορετικοί συνδυασμοί, είδη, στελέχη και μηχανισμοί αντοχής αναλύονται συγκεντρωτικά, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η εξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων. Προοπτικές κλινικές μελέτες οι οποίες θα μπορούσαν να απαντήσουν σε τέτοια ερωτήματα είναι δύσκολο να διεξαχθούν, ειδικά για σχήματα τριπλής συνδυαστικής θεραπείας, όπου απαιτείται μεγάλος αριθμός ασθενών και ομάδων θεραπείας. Οι μελέτες σε πειραματόζωα είναι δυσχερείς λόγω της διαφορετικής παθοφυσιολογίας των εν λόγω λοιμώξεων, της διαφορετικής φαρμακοκινητικής των αντιβακτηριακών φαρμάκων και των ηθικών ζητημάτων που προκύπτουν. Τα *in vitro* πειράματα σε στατικά μοντέλα, όπου η συγκέντρωση των φαρμάκων παραμένει σταθερή (μικροαραιώσεις σε ζωμό, μελέτες θανάτωσης-χρόνου), δεν προσομοιώνουν την αλλαγή των συγκεντρώσεων με την πάροδο του χρόνου και τα διαφορετικά σχήματα χορήγησης φαρμάκων *in vivo*.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η απόδοση σχημάτων διπλής και τριπλής συνδυαστικής θεραπείας έναντι στελεχών *K. pneumoniae* με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής και μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στη μεροπενέμη, σε ένα *in vitro* φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό (PK/PD) μοντέλο. Συγκεκριμένα, προσομοιώθηκε η φαρμακοκινητική της μεροπενέμης, της κολιστίνης και της τιγκεκυκλίνης όταν χορηγούνται μόνες τους και σε συνδυασμό (διπλό και τριπλό) και συγκρίθηκε η βακτηριοκτόνος δράση του κάθε σχήματος με τη δράση της μονοθεραπείας για στελέχη με διαφορετικές MIC στη μεροπενέμη.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Βακτηριακά στελέχη, φάρμακα και θρεπτικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν ένα στέλεχος άγριου τύπου και έξι στελέχη CP-Kr που παρήγαγαν τις ευρύτερα διαδεδομένες καρβαπενεμάσες στην Ελλάδα και είχαν αυξανόμενες τιμές MIC σε μεροπενέμη (16–512 mg/L), κολιστίνη (0,25–32 mg/L) και τιγκεκυκλίνη (0,125–4 mg/L) (πίν. 1). Τα στελέχη ανακαλλιέργηθηκαν σε τρυβλία άγαρ McConkey (MCK) και επωάστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Με τη βοήθεια θολωσιμέτρου παρασκευάστηκε εναιώρημα 0,5 McFarland, το οποίο αραιώθηκε ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10⁷ CFU/mL. Χρησιμοποιήθηκαν τα κλινικά ενδοφλέβια φαρμακευτικά προϊόντα μεροπενέμης (Meronem 500 mg/vial IV) και τιγκεκυκλίνης (Tigecycline 5 g, Pfizer, Greece) και η καθαρή ουσία κολιστίνης (colistin sulphate, Sigma-Aldrich, Athens, Greece). Το θρεπτικό υλικό ήταν Müller-Hinton εξισορροπημένο ως προς τα κατιόντα σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (cation-adjusted Müller-Hinton broth, CAMHB).

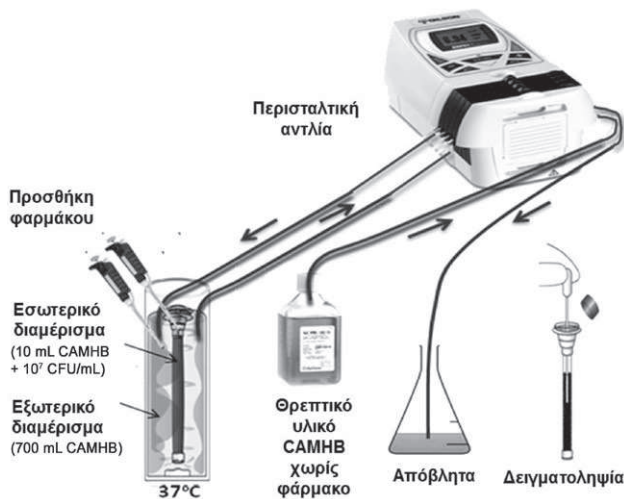
In vitro φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο

Το *in vitro* φαρμακοκινητικό μοντέλο αποτελείται από δύο δι-

Πίνακας 1. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Παρουσιάζονται οι μηχανισμοί αντοχής και οι τιμές MIC για την κολιστίνη, τη μεροπενέμη και την τιγκεκυκλίνη όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό κατά CLSI.

Στέλεχος	Μηχανισμός αντοχής	MIC (mg/L)		
		Μεροπενέμη	Κολιστίνη	Τιγκεκυκλίνη
TZAN59	Κανένας	0,06	0,5	0,125
SEC2	VIM	16	0,25	1
SEC4	VIM	256	0,5	2
1781	NDM	512	32	4
1780	KPC+VIM	256	2	1
1782	KPC	64	4	0,5
EUG	KPC+VIM+SHV-5	128	2	1

αμερίσματα, το εσωτερικό και το εξωτερικό (εικ. 1).¹⁶ Το εξωτερικό διαμέρισμα περιλαμβάνει κωνική φιάλη η οποία περιέχει 700 mL θρεπτικού ζωμού CAMHB και τοποθετείται σε εστία με μαγνητικό αναδευτήρα και θέρμανση στους 37 °C. Το εσωτερικό διαμέρισμα αποτελείται από έναν σωλήνα από ημιδιαπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Float-A-Lyzer®, Spectrum Labs, Breda, The Netherlands) που επιτρέπει την αμφίδρομη διάχυση του φαρμάκου και του θρεπτικού υλικού, εμποδίζοντας τη διαφυγή των βακτηρίων. Κάθε σωληνάριο περιέχει 10 mL θρεπτικού ζωμού CAMHB και εναιώρημα 10⁷ CFU/mL από κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 1. *In vitro* φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό (PK/PD) μοντέλο προσομοίωσης της ανθρώπινης φαρμακοκινητικής αντιβακτηριακών φαρμάκων έναντι *K. pneumoniae*. Αποτελείται από (α) ένα γυάλινο δοχείο το οποίο περιέχει 700 mL θρεπτικού υλικού (εξωτερικό διαμέρισμα), (β) έναν σωλήνα διάχυσης όγκου 10 mL που επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση μορίων με μοριακό βάρος <1000 kDa, στον οποίο εισάγεται εναιώρημα του βακτηρίου (εσωτερικό διαμέρισμα) και (γ) μια περισταλτική αντλία που εισάγει θρεπτικό υλικό στο δοχείο, ενώ, παράλληλα, απομακρύνει το περιεχόμενο του σύμφωνα με τον ρυθμό κάθαρσης του εξεταζόμενου φαρμάκου.

In vitro φαρμακοκινητική

Προσομοιώθηκαν τα δοσολογικά σχήματα ωριαίας έγχυσης 100 mg τιγκεκυκλίνης q12, 4,5 MU κολιστίνης q12 και 1 g μεροπενέμης q8. Λαμβάνοντας υπ' όψη τον βαθμό σύνδεσης στις πρωτεΐνες της τιγκεκυκλίνης (80%), της κολιστίνης (60%) και της μεροπενέμης (2%), οι μέγιστες συγκεντρώσεις ελεύθερων μορίων που μπορεί να επιτευχθούν στον ορό των ασθενών με τα συγκεκριμένα σχήματα είναι 0,3 mg/L, 1,6 mg/L και 60 mg/L, με χρόνο ημιζωής >14 ώρες, 12 ώρες και <2 ώρες, αντίστοιχα.¹⁷⁻¹⁹ Οι παραπάνω συγκεντρώσεις μεροπενέμης εισήχθησαν στο εξωτερικό και στο εσωτερικό διαμέρισμα του *in vitro* μοντέλου ανά 8 ώρες, ενώ η τιγκεκυκλίνη και η κολιστίνη ανά 12 ώρες για 48 ώρες, προσομοιώνοντας την ημερήσια φαρμακοκινητική των φαρμάκων στον άνθρωπο για δύο ημέρες. Λόγω της φυσικής αποικοδόμησης της κολιστίνης, προστέθηκε κολιστίνη συγκέντρωσης 0,4 mg/L στο εσωτερικό και στο εξωτερικό διαμέρισμα μετά από 9, 21, 33 και 45 ώρες. Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων προσδιορίστηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με μικροβιολογική δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ, χρησιμοποιώντας ένα ευαίσθητο στέλεχος *E. coli*.²⁰ Η εν λόγω μέθοδος ανιχνεύει συγκεντρώσεις από 0,06–120 mg/L με ικανοποιητική επαναληψιμότητα (συντελεστής διακύμανσης CV <25%) και γραμμική συσχέτιση των συγκεντρώσεων με τις ζώνες αναστολής ($r^2 >0,95$).

In vitro φαρμακοδυναμική

Το βακτηριακό φορτίο στα εσωτερικά διαμερίσματα αξιολογήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα με δειγματοληψία 20 μL και ποσοτικές καλλιέργειες σε τρυβλία με Müller-Hinton άγαρ, τα οποία επώσθησαν για 24 ώρες στους 37 °C. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά σχεδιάστηκαν καμπύλες θανάτωσης-χρόνου για κάθε στέλεχος και δοσολογικό σχήμα.

Ανάλυση

Προκειμένου να μελετηθεί η σχέση μεταξύ της τιμής MIC στη μεροπενέμη των CP-Kp και της αντιβακτηριακής δράσης της μονοθεραπείας, των διπλών συνδυασμών και του τριπλού συνδυασμού, για κάθε σχήμα και στέλεχος υπολογίστηκε η μεταβολή του βακτηριακού φορτίου στις 48 ώρες σε σύγκριση με το αρχικό εναιώρημα. Η σχέση μεταξύ της MIC στη μεροπενέμη και της μεταβολής log₁₀ CFU/mL στο τέλος του πειράματος αναλύθηκε με γραμμική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο Emax που περιγράφεται από την εξίσωση $E = (E_{max} - E_{min}) \times (MIC / MIC_{50})^m / [1 + (MIC / MIC_{50})^m] + E_{min}$, όπου E είναι η εξαρτημένη μεταβλητή 48h-μεταβολή log₁₀ CFU/mL από το αρχικό εναιώρημα, MIC είναι η τιμή MIC του κάθε στελέχους (ανεξάρτητη μεταβλητή), E_{max} και E_{min} είναι η μέγιστη και η ελάχιστη 48h-μεταβολή log₁₀ CFU/mL, αντίστοιχα, MIC₅₀ είναι η τιμή MIC που αντιστοιχεί στο 50% της E_{max}, και m είναι η κλίση των καμπυλών MIC-μεταβολής log₁₀ CFU/mL (Graph Pad Prism 4.03).

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της κολιστίνης και της τιγκεκυκλίνης, μόνες τους και σε συνδυασμό, στη βακτηριοκτόνο

δράση της μεροπενέμης, υπολογίστηκε η μέγιστη MIC μεροπενέμης των CP-Kp, όπου η μονοθεραπεία της μεροπενέμης, οι διπλοί συνδυασμοί και ο τριπλός συνδυασμός μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη εμφάνισαν βακτηριοκτόνο δράση (μείωση $3 \log_{10}$ CFU/mL του αρχικού εναιωρήματος).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

In vitro φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική των τριών φαρμάκων τιγκεκυκλίνη, κολιστίνη και μεροπενέμη προσομοιώθηκε ικανοποιητικά στο *in vitro* μοντέλο (εικ. 2). Οι μέσες τιμές fC_{max} και $t_{1/2}$ ήταν 2 mg/L και 10–12 ώρες για την κολιστίνη και 40–60 mg/L και <4 ώρες για τη μεροπενέμη. Για την τιγκεκυκλίνη, το επιτευχθέν fC_{max} ήταν 0,2–0,3 mg/L, με τις συγκεντρώσεις να μειώνονται διφασικά με $t_{1/2}$ 2–4 ώρες στην πρώτη φάση και >12 ώρες στη δεύτερη φάση, όπως και στο αίμα των ανθρώπων.^{17–19}

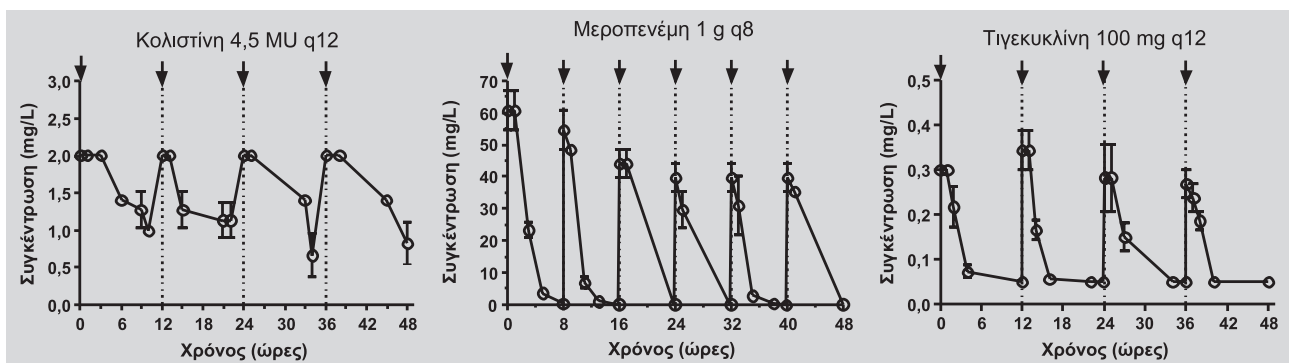
In vitro φαρμακοδυναμική

(α) *Μονοθεραπείες*. Οι καμπύλες θανάτωσης-χρόνου για κάθε δοσολογικό σχήμα και στέλεχος παρουσιάζονται στην εικόνα 3. Η μονοθεραπεία της μεροπενέμης ήταν αποτελεσματική κατά του ευαίσθητου στελέχους με MIC 0,06 mg/L, αλλά όχι κατά των υπολοίπων με υψηλότερες τιμές MICs. Η μονοθεραπεία της κολιστίνης είχε αρχικά βακτηριοκτόνο δράση με μείωση βακτηριακού πληθυσμού κατά $4 \log_{10}$ CFU/mL. Όμως, μετά από αρχική μείωση του βακτηριακού φορτίου παρατηρήθηκε ανάπτυξη εντός 12 ωρών. Η μονοθεραπεία της τιγκεκυκλίνης είχε μικρή έως αμελητέα δράση με <1 \log_{10} CFU/mL μείωση βακτηριακού φορτίου στις 12 ώρες μόνο για το στέλεχος με MIC 0,125 mg/L και ανάπτυξη στα επίπεδα του μάρτυρα χωρίς φάρμακο στις 48

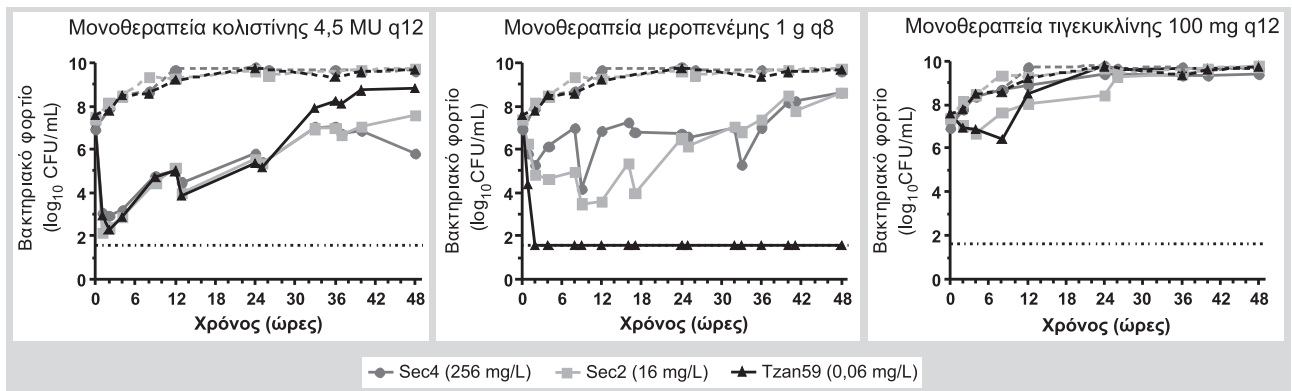
ώρες. Παρά τις διαφορετικές τιμές MIC στην κολιστίνη και στην τιγκεκυκλίνη, η δράση των μονοθεραπειών δεν διέφερε σε σύγκριση με τη μεροπενέμη, όπου υπήρχε μια σαφής σχέση MIC-αντιβακτηριακής δράσης στο *in vitro* μοντέλο.

(β) *Διπλή συνδυαστική θεραπεία*. Από τους διπλούς συνδυασμούς, η τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη είχε τη μικρότερη δράση, μιας και μετά από σημαντική μείωση του βακτηριακού φορτίου στις 12 ώρες ακολούθησε πλήρης ανάπτυξη στα επίπεδα του μάρτυρα χωρίς φάρμακο, όπως παρατηρήθηκε και με τη μονοθεραπεία της κολιστίνης (εικ. 4). Ο διπλός συνδυασμός μεροπενέμης + τιγκεκυκλίνης ήταν βακτηριοκτόνος μόνο για το στέλεχος άγριου τύπου με MIC 0,06 mg/L, όπως συνέβη και με τη μονοθεραπεία της μεροπενέμης, ενώ για τα άλλα δύο στελέχη με MIC 16 mg/L και 256 mg/L παρατηρήθηκε μείωση του αρχικού βακτηριακού φορτίου κατά 1–2 \log_{10} CFU/mL. Για τα συγκεκριμένα στελέχη φαίνεται ότι η τιγκεκυκλίνη ενίσχυσε τη δράση της μεροπενέμης, μιας και η μεροπενέμη μόνη της δεν κατόρθωσε να μειώσει το αρχικό τους βακτηριακό φορτίο. Τέλος, ο πλέον αποτελεσματικός διπλός συνδυασμός ήταν μεροπενέμη+κολιστίνη ο οποίος ήταν βακτηριοκτόνος για στελέχη με MIC 0,06 mg/L και 16 mg/L και κατόρθωσε να μειώσει το αρχικό βακτηριακό φορτίο του στελέχους με MIC 256 mg/L κατά 2 \log_{10} CFU/mL. Παρ' όλο που η δράση του διπλού συνδυασμού ήταν παρόμοια με τη δράση των μονοθεραπειών για τα στελέχη με MIC 0,06 mg/L και 256 mg/L, ο διπλός συνδυασμός ήταν περισσότερο δραστήσιος από τις μονοθεραπείες για το στέλεχος με MIC 16 mg/L.

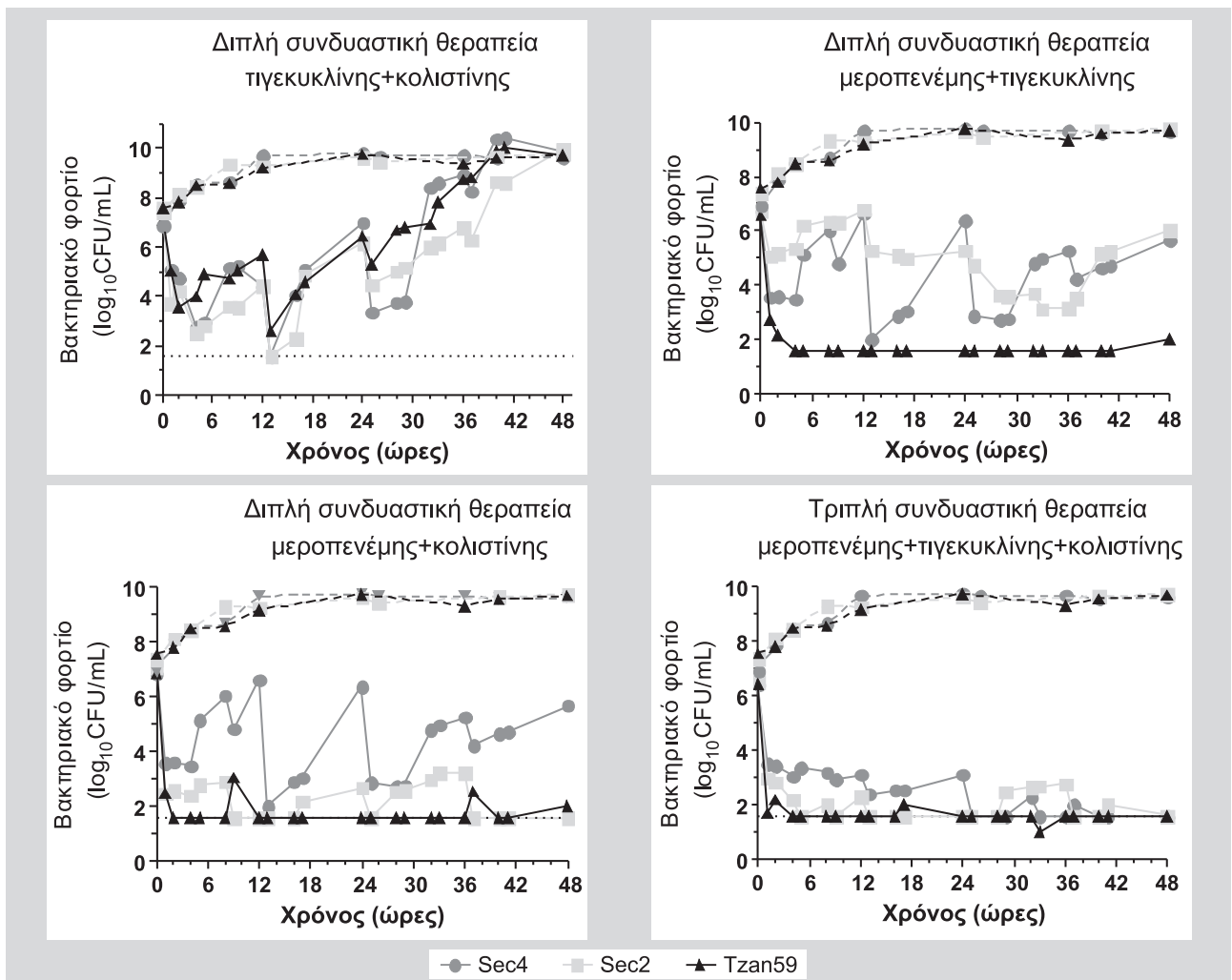
(γ) *Τριπλή συνδυαστική θεραπεία*. Ο τριπλός συνδυασμός παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση για τα τρία στελέχη TZAN59, SEC2 και SEC4, περιλαμβανομένων και των δύο στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση τύπου VIM, με τιμές MIC 16 mg/L και 256 mg/L (εικ. 4). Ειδικά για το τελευταίο στέλεχος με MIC 256 mg/L, κανένας διπλός συν-



Εικόνα 2. *In vitro* φαρμακοκινητική 4,5 MU κολιστίνης q12, 1 g μεροπενέμης q8 και 100 mg τιγκεκυκλίνης q12 στο *in vitro* φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό (PK/PD) μοντέλο. Τα βέλη αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία όπου προστέθηκε νέο φάρμακο στο *in vitro* μοντέλο προκειμένου να προσομοιωθούν οι 12ωρες χορηγήσεις της τιγκεκυκλίνης και της κολιστίνης και η 8ωρη χορήγηση της μεροπενέμης.



Εικόνα 3. Φαρμακοδυναμική μονοθεραπειών. Καμπύλες θανάτωσης-χρόνου τριών στελεχών *K. pneumoniae* (TZAN59, SEC2, SEC4) με αυξανόμενες τιμές MIC στη μεροπενέμη (0,06 mg/L, 16 mg/L και 256 mg/L, αντίστοιχα) στο *in vitro* μοντέλο όπου προσομοιώθηκαν τα κλινικά δοσολογικά σχήματα μονοθεραπείας για μεροπενέμη (1 g q8h), κολιστίνη (4,5 MU q12h) και τιγκεκυκλίνη (100 mg q12). Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών στελεχών σε θρεπτικό ζωμό χωρίς φάρμακο.



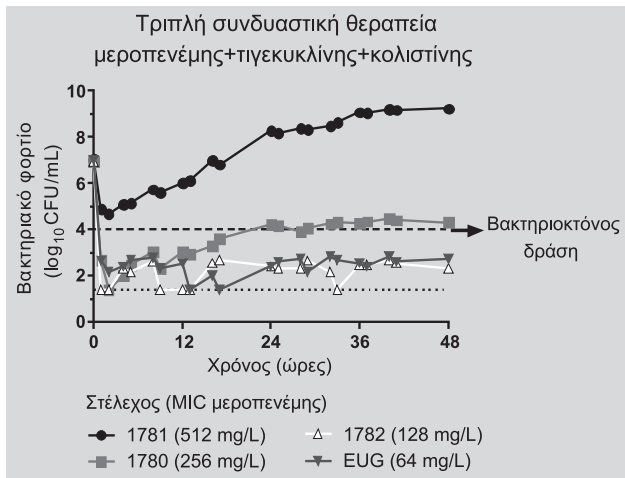
Εικόνα 4. Φαρμακοδυναμική διπλής και τριπλής συνδυαστικής θεραπείας. Καμπύλες θανάτωσης-χρόνου τριών στελεχών *K. pneumoniae* (TZAN59, SEC2, SEC4) με αυξανόμενες τιμές MIC στη μεροπενέμη (0,06 mg/L, 16 mg/L και 256 mg/L, αντίστοιχα) στο *in vitro* μοντέλο όπου προσομοιώθηκαν οι τρεις διπλές συνδυαστικές θεραπείες και μια τριπλή συνδυαστική θεραπεία μεροπενέμης (1 g q8h), κολιστίνης (4,5 MU q12h) και τιγκεκυκλίνης (100 mg q12). Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των τριών στελεχών σε θρεπτικό ζωμό χωρίς φάρμακο.

δυσασμός δεν ήταν τόσο δραστηριός όσο ο τριπλός. Τέλος, ο τριπλός συνδυασμός ήταν βακτηριοκτόνος και για στελέχη που παρήγαγαν άλλες καρβαπενεμάσες ή συνδυασμό καρβαπενεμασών και τιμές MIC μέχρι 256 mg/L (εικ. 5).

Βακτηριοκτόνος δράση

Η σχέση μεταξύ MIC μεροπενέμης και μεταβολής βακτηριακού φορτίου περιγράφηκε επαρκώς από το Emax μοντέλο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 6 ($r^2 > 0,97$). Οι

καμπύλες των συνδυασμών είναι εμφανώς μετατοπισμένες δεξιά σε σύγκριση με την καμπύλη της μονοθεραπείας, υποδηλώνοντας ότι η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη ενίσχυσαν τη δράση της μεροπενέμης με την ακόλουθη σειρά: τιγκεκυκλίνη < κολιστίνη < τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη. Η μέγιστη τιμή MIC μεροπενέμης όπου εμφανίστηκε βακτηριοκτόνος δράση έναντι στελεχών CP-Kp ήταν 1 mg/L, 8 mg/L, 128 mg/L και 256 mg/L για τη μονοθεραπεία μεροπενέμης, τον διπλό συνδυασμό μεροπενέμης+τιγκεκυκλίνης, τον διπλό συνδυασμό μεροπενέμης+κολιστίνης και τον τριπλό συνδυασμό μεροπενέμης+τιγκεκυκλίνης+κολιστίνης, αντίστοιχα (εικ. 6).

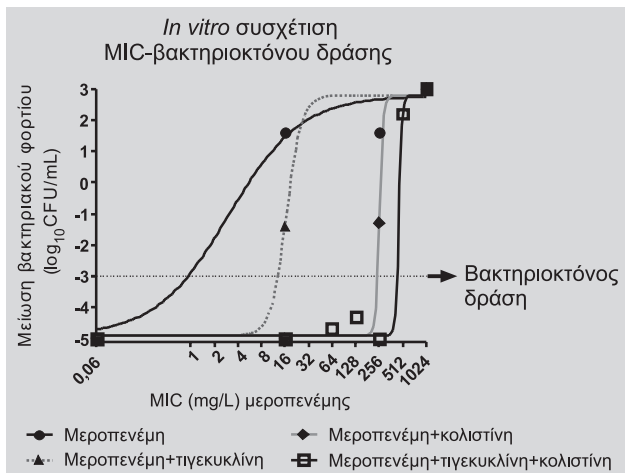


Εικόνα 5. Φαρμακοδυναμική τριπλής συνδυαστικής θεραπείας σε στελέχη με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής. Καμπύλες θανάτωσης-χρόνου τεσσάρων επί πλέον στελεχών *K. pneumoniae* (1782, EUG, 1780 και 1781) με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής και αυξανόμενες τιμές MIC στη μεροπενέμη (64 mg/L, 128 mg/L, 256 mg/L και 512 mg/L, αντίστοιχα) στο *in vitro* μοντέλο όπου προσομοιώθηκε η τριπλή συνδυαστική θεραπεία μεροπενέμης (1 g q8h), κολιστίνης (4,5 MU q12h) και τιγκεκυκλίνης (100 mg q12).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι καρβαπενέμες αποτελούν τη θεραπεία εκλογής για νοσοκομειακές λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae*, αλλά τα ολοένα αυξανόμενα ποσοστά αντοχής τους σε αυτές έχουν θέσει υπό συζήτηση τον πολύτιμο ρόλο τους. Παρά το πολυανθεκτικό προφίλ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών, παρατηρείται ευαισθησία σε αντιβακτηριακά όπως η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη, αλλά και εύρος στα επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες, τα οποία συχνά είναι σχετικά χαμηλά (≤ 16 mg/L).^{21,22} Επίσης, εναλλακτικά σχήματα παρατεταμένης έγχυσης μπορεί να αυξήσουν τη δράση των καρβαπενεμών για στελέχη με τιμές MIC μέχρι και 8 mg/L.²³ Ωστόσο, η εμφάνιση στελεχών με υψηλότερες τιμές MIC, που δεν μπορούν να καλυφθούν από παρατεταμένα σχήματα έγχυσης μονοθεραπείας μεροπενέμης, έχει οδηγήσει στη διερεύνηση της χρήσης συνδυαστικής θεραπείας ως μιας εναλλακτικής προσέγγισης.

Στην παρούσα μελέτη συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα κλινικών δοσολογικών σχημάτων μεροπενέμης, κολιστίνης και τιγκεκυκλίνης έναντι κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν μία ή περισσότερες από τις πλέον διαδεδομένες στην Ελλάδα καρβαπενεμάσες (VIM, KPC, NDM, KPC+VIM) και σε συνδυασμό με την επίσης διαδεδομένη στη χώρα μας εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάση SHV-5 με τη χρήση ενός φαρμακοκινητικού-φαρμακοδυναμικού μοντέλου. Τα κλινικά σχήματα τα οποία επιλέχθηκαν είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα και προσομοιώθηκαν οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στον ορό ασθενών μετά από χορήγηση 100 mg τιγκεκυκλίνης κάθε 12 ώρες, 4,5 MU κολιστίνης κάθε 12 ώρες και 1 g μεροπενέμης κάθε 8 ώρες ως ωριαίες εγχύσεις. Οι μονοθεραπείες τιγκεκυκλίνης και κολιστίνης δεν ήταν αποτελεσματικές έναντι στελεχών CP-Kp, ανεξάρτητα από την τιμή MIC, σε αντίθεση με τη μονοθεραπεία μεροπενέμης όπου βακτηριοκτόνος δράση υπολογίστηκε για στελέχη με τιμές MIC ≤ 1 mg/L. Από τους διπλούς συνδυασμούς, η τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη δεν ήταν



Εικόνα 6. *In vitro* συσχέτιση της τιμής MIC στη μεροπενέμη και της δράσης της μονοθεραπείας και της συνδυαστικής θεραπείας έναντι στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CP-Kp).

δραστική για κανένα στέλεχος ενώ οι διπλοί συνδυασμοί μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη και μεροπενέμη+κολιστίνη ήταν βακτηριοκτόνοι για στελέχη CP-Kp με τιμές MIC ≤ 8 και ≤ 128 mg/L, αντίστοιχα. Το πιο δραστικό σχήμα ήταν ο τριπλός συνδυασμός μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη+κολιστίνη, ο οποίος ήταν βακτηριοκτόνος για στελέχη με τιμές MIC ≤ 256 mg/L.

Σε προηγούμενες *in vitro* μελέτες σε στατικά μοντέλα μικροαραιώσεων σε ζωμό, οι διπλοί συνδυασμοί κολιστίνη+μεροπενέμη και κολιστίνη+τιγκεκυκλίνη αλλά όχι ο συνδυασμός μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη ήταν συνεργικοί έναντι CP-Kp στελεχών με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής και ιδιαίτερα για στελέχη με MIC στη μεροπενέμη ≥ 8 mg/L.²⁴ Όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης (7 mg/L) σε στατικά μοντέλα θανάτωσης-χρόνου, ο συνδυασμός μεροπενέμης+κολιστίνης δεν ήταν βακτηριοκτόνος έναντι MBL(+) στελεχών CP-Kp, γεγονός που υποδηλώνει τη δόσοεξαρτώμενη φύση των φαρμακοδυναμικών αλληλεπιδράσεων.²⁵ Ωστόσο, σε αντίθεση με *in vitro* μελέτες σε στατικά μοντέλα, μελέτες σε δυναμικά μοντέλα έδειξαν ότι ο συνδυασμός μεροπενέμης (2 g σε τρίωρη έγχυση q8)+τιγκεκυκλίνης (100 mg q12) ήταν βακτηριοκτόνος στις 48 ώρες, όπως βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη.²⁶ Είναι αναμενόμενο ότι η φαρμακοδυναμική των αντιβιοτικών και ιδιαίτερα των χρονο-εξαρτώμενων φαρμάκων όπως η μεροπενέμη να διαφέρει μεταξύ μελετών σε στατικά μοντέλα όπου η συγκέντρωση παραμένει σταθερή (υψηλές τιμές $fT > MIC$) και μελετών σε δυναμικά μοντέλα όπου η συγκέντρωση μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (φυσιολογικές τιμές $fT > MIC$). Η προσθήκη τρίτου αντιβιοτικού σε στατικά μοντέλα μικροαραιώσεων δεν αύξησε σημαντικά τον βαθμό συνέργειας στους διπλούς συνδυασμούς με κολιστίνη, μεροπενέμη και τιγκεκυκλίνη.²⁴ Ωστόσο, η απουσία συνέργειας δεν υποδηλώνει την έλλειψη δραστικότητας. Με βάση την καθιερωμένη ορολογία της συνέργειας, απαιτείται μείωση των MIC των φαρμάκων μόνων τους κατά > 2 αραιώσεις όταν συνδυαστούν. Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη τιγκεκυκλίνης στον διπλό συνδυασμό μεροπενέμη+κολιστίνη αύξησε τη βακτηριοκτόνο δράση έναντι βακτηρίων με MIC υψηλότερη κατά μία αραιώση (από 128 mg/L σε 256 mg/L). Αν και δεν πληροί τα κριτήρια της συνέργειας, η ενίσχυση της βακτηριοκτόνου δράσης του διπλού συνδυασμού είναι σημαντική. Σε *in vivo* μελέτες σε λοιμώξεις μηρού, οι διπλοί συνδυασμοί τιγκεκυκλίνης+κολιστίνης και τιγκεκυκλίνης+μεροπενέμης δεν ήταν αποτελεσματικοί.¹⁵ Ένας πιθανός μηχανισμός αυτής της ενίσχυσης της δράσης της μεροπενέμης παρουσία κολιστίνης και τιγκεκυκλίνης θα μπορούσε να ήταν το γεγονός ότι η κολιστίνη αποσταθεροποιεί και δημιουργεί

πόρους στις βακτηριακές μεμβράνες, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα σε άλλα αντιβιοτικά, όπως η μεροπενέμη και η τιγκεκυκλίνη, τα οποία δρουν σε διαφορετικούς στόχους.

Σε πολλές κλινικές μελέτες οι οποίες αφορούν στη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση με τη χρήση καρβαπενεμών, βρέθηκε ότι αν το στέλεχος έχει MIC ≤ 8 mg/L στις καρβαπενέμες, η συνδυαστική θεραπεία με καρβαπενέμη και ένα ακόμη δραστικό φάρμακο (μια αμινογλυκοσίδη ή κολιστίνη ή τιγκεκυκλίνη) συσχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη θνητότητα απ' ό,τι η συνδυαστική θεραπεία με άλλα φάρμακα εκτός καρβαπενεμών αλλά με *in vitro* δραστικότητα.²⁷ Τα εν λόγω ευρήματα ήταν επίσης σε συμφωνία με φαρμακοκινητικά/φαρμακοδυναμικά δεδομένα από ανθρώπους.²⁸⁻³⁰ Σε μια πολυκεντρική αναδρομική μελέτη ασθενών με βακτηριαιμία από στελέχη CP-Kp, η τριπλή συνδυαστική θεραπεία με κολιστίνη+μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη σχετιζόταν με χαμηλότερη θνητότητα απ' ό,τι οι μονοθεραπείες και οι διπλές συνδυαστικές θεραπείες.³¹ Μάλιστα, το ποσοστό επιβίωσης για λοιμώξεις από στελέχη με υψηλές τιμές MIC στη μεροπενέμη (8 mg/L και ≥ 16 mg/L) ήταν σημαντικό (75% και 65%, αντίστοιχα), όπως έδειξε και η παρούσα μελέτη, όπου ο τριπλός συνδυασμός ήταν βακτηριοκτόνος για στελέχη με τιμές MIC στη μεροπενέμη ≥ 16 mg/L. Σε μια άλλη αναδρομική μελέτη της ίδιας ομάδας βρέθηκε ότι το ποσοστό επιβίωσης ασθενών με λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη ήταν σημαντικά υψηλότερο όταν χρησιμοποιήθηκε η υψηλή δόση τιγκεκυκλίνης (100 mg q12) στη συνδυαστική θεραπεία μόνο για στελέχη CP-Kp και όχι για *Acinetobacter baumannii* ή άλλα βακτήρια.³²

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η υπεροχή της τριπλής συνδυαστικής θεραπείας που βρέθηκε σε αναδρομικές κλινικές μελέτες έχει φαρμακοδυναμική προέλευση, καθώς αυξάνεται η βακτηριοκτόνος δράση του τριπλού συνδυασμού ακόμη και για στελέχη με MIC 256 mg/L στη μεροπενέμη. Επί πλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η βακτηριοκτόνος δράση της μεροπενέμης αυξάνεται και με τους διπλούς συνδυασμούς μεροπενέμη+τιγκεκυκλίνη και μεροπενέμη+κολιστίνη για στελέχη με MIC 8 mg/L και 128 mg/L, αντίστοιχα, και ότι η σχετική δράση παρατηρήθηκε με την ημίωρη έγχυση 1 g μεροπενέμης q8, 4,5 MU κολιστίνης q12 και την υψηλή δόση τιγκεκυκλίνης των 100 mg q12. Επομένως, οι παραπάνω συνδυαστικές θεραπείες καθιερωμένων δοσολογικών σχημάτων μπορεί να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της αντιβακτηριακής θεραπείας έναντι λοιμώξεων από CP-Kp χωρίς να απαιτείται αύξηση των δόσεων που ενδεχομένως να οδηγούσε σε αυξημένη τοξικότητα.

ABSTRACT

Combination therapy against multidrug resistant carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic modelM. TSALA,¹ S. VOURLI,¹ G. DAIKOS,² A. TSAKRIS,³ S. POURNARAS,¹ J. MELETIADIS¹

¹Clinical Microbiology Laboratory, "Attikon" University General Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ²First Department of Internal Medicine, "Laiko" General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ³Department of Microbiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2018, 35(2):198–206

OBJECTIVE Infections by multidrug resistant carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates (CP-Kp) are associated with a high mortality rate, particularly in immunocompromised patients. Because of an increase in resistance rates to carbapenems and the lack of new active antibacterial drugs, combination therapy is often used against CP-Kp. In the present study, human pharmacokinetics of meropenem, colistin and tigecycline monotherapy and combination therapy (double and triple) were simulated in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model. Antibacterial activity against CP-Kp isolates with different resistance mechanisms and reduced susceptibility to meropenem was assessed. **METHOD** The effect was studied of the triple combination meropenem+colistin+tigecycline against a wild-type susceptible and six CP-Kp isolates (two producing VIM, one KPC, one NDM, one KPC+VIM and one KPC+VIM+SHV-5) with MIC of meropenem 0.06 mg/L and 16–512 mg/L, respectively. The human plasma concentration-time profiles of 100 mg tigecycline q12, 4.5 MU colistin q12 και 1 g meropenem q8 as one hour' infusion were simulated for 48 hours. Drug levels were measured by microbiological assay. Bacterial burden (\log_{10} CFU/mL) was determined with quantitative cultures at regular time intervals and the reduction from the initial inoculum of 10^7 CFU/mL was calculated at 48 hours. The bactericidal activity ($>3 \log_{10}$ CFU/mL reduction)-MIC relationship of monotherapy and combination therapy regimens was analyzed using the Emax model. **RESULTS** The wild-type isolate was killed by meropenem monotherapy and combination therapy regimens. Tigecycline and colistin alone and in combination were not active. Against the CP-Kp isolates, meropenem was not effective alone but its activity was enhanced by tigecycline, colistin and tigecycline+colistin. The highest MIC of meropenem where bactericidal activity was found against CP-Kp isolates were 1 mg/L, 8 mg/L, 128 mg/L and 256 mg/L for meropenem monotherapy, the double combinations meropenem+tigecycline and meropenem+colistin and the triple combination meropenem+tigecycline+colistin, respectively. **CONCLUSIONS** The double combinations meropenem+tigecycline and meropenem+colistin and the triple combination meropenem+tigecycline+colistin were effective against CP-Kp isolates with MIC ≥ 8 mg/L. Combination therapy may increase the efficacy of antimicrobial therapy and can provide an alternative effective approach for the treatment of multidrug resistant infections.

Key words: Colistin, Combination therapy, *Klebsiella pneumoniae*, Meropenem, Tigecycline

Βιβλιογραφία

1. PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998, 11:589–603
2. TZOUVELEKIS LS, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOGIOU M, TASSIOS PT, DAIKOS GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012, 25:682–707
3. DAIKOS GL, PETRIKKOS P, PSICHOGIOU M, KOSMIDIS C, VRYONIS E, SKOUTELIS A ET AL. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:1868–1873
4. ZARKOTOU O, POURNARAS S, TSELIOTI P, DRAGOUMANOS V, PIT-IRIGA V, RANELLOU K ET AL. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:1798–1803
5. QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20:440–458
6. AKOVA M, DAIKOS GL, TZOUVELEKIS L, CARMELI Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18:439–448
7. DERIS ZZ, YU HH, DAVIS K, SOON RL, JACOB J, KU CK ET AL. The combination of colistin and doripenem is synergistic against *Klebsiella pneumoniae* at multiple inocula and suppresses colistin

- resistance in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:5103–5112
8. KORVICK JA, BRYAN CS, FARBER B, BEAM TR Jr, SCHENFELD L, MUDER RR ET AL. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: Outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36:2639–2644
 9. CARMELI Y, AKOVA M, CORNAGLIA G, DAIKOS GL, GARAU J, HARBARTH S ET AL. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: Therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010, 16:102–111
 10. GARBINO J, LEW D, HIRSCHL B, ROHNER P. Caspofungin in the treatment of oropharyngeal candidiasis. *Int J Clin Pract* 2003, 57:143–144
 11. HIRSCH EB, TAM VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65:1119–1125
 12. POURNARAS S, VRIONI G, NEOU E, DENDRINOS J, DIMITROULIA E, POULOU A ET AL. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 37:244–247
 13. ELEMAM A, RAHIMIAN J, DOYMAZ M. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010, 48:3558–3562
 14. QURESHI ZA, PATERSON DL, POTOSKI BA, KILAYKO MC, SANDOVSKY G, SORDILLO E ET AL. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:2108–2113
 15. MICHAIL G, LABROU M, PITIRIGA V, MANOUSAKA S, SAKELLARIDIS N, TSAKRIS A ET AL. Activity of tigecycline in combination with colistin, meropenem, rifampin, or gentamicin against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57:6028–6033
 16. TSALA M, VOURLI S, KOTSAKIS S, DAIKOS GL, TZOUVELEKIS L, ZERVA L ET AL. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of meropenem against VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates: Clinical implications. *J Med Microbiol* 2016, 65:211–218
 17. MEAGHER AK, AMBROSE PG, GRASELA TH, ELLIS-GROSSE EJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of tigecycline. *Clin Infect Dis* 2005, 41(Suppl 5):S333–S340
 18. DAIKOS GL, SKIADA A, PAVLEAS J, VAFIADI C, SALATAS K, TOFAS P ET AL. Serum bactericidal activity of three different dosing regimens of colistin with implications for optimum clinical use. *J Chemother* 2010, 22:175–178
 19. NICOLAU DP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. *Clin Infect Dis* 2008, 47(Suppl 1):S32–S40
 20. PITKIN DH, MARIN-MAZUELOS E. Bioassay methods for antimicrobial and antifungal agents. In: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC (eds) *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. 10th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2007:313
 21. GIAMARELLOU H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: How to treat and for how long. *Int J Antimicrob Agents* 2010, 36(Suppl 2):S50–S54
 22. TZOUVELEKIS LS, MARKOGIANNAKIS A, PIPERAKI E, SOULI M, DAIKOS GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20:862–872
 23. VOURLI S, TSALA M, KOTSAKIS S, DAIKOS GL, TZOUVELEKIS L, MIRIAGOUV ET AL. Comparison of short versus prolonged infusion of standard dose of meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in different patient groups: A pharmacokinetic-pharmacodynamic approach. *J Pharm Sci* 2016, 105:1513–1518
 24. STEIN C, MAKAREWICZ O, BOHNERT JA, PFEIFER Y, KESSELMEIER M, HAGEL S ET AL. Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *PLoS One* 2015, 10:e0126479
 25. TÄNGDÉN T, HICKMAN RA, FORSBERG P, LAGERBÄCK P, GISKE CG, CARLS O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:1757–1762
 26. LIM TP, CAI Y, HONG Y, CHAN EC, SURANTHRAN S, TEO JQ ET AL. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59:2515–2524
 27. DAIKOS GL, TSAOUSI S, TZOUVELEKIS LS, ANYFANTIS I, PSICHOGIOU M, ARGYROPOULOU A ET AL. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:2322–2328
 28. 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
 29. KITCHEL B, RASHEED JK, ENDIMIANI A, HUJER AM, ANDERSON KF, BONOMO RA ET AL. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:4201–4207
 30. CRAIG WA. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic. *Clin Infect Dis* 1997, 24(Suppl 2):S266–S275
 31. TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, TRECARCHI EM, TUMIETTO F, MARCHESE A ET AL. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012, 55:943–950
 32. DE PASCALE G, MONTINI L, PENNISI M, BERNINI V, MAVIGLIA R, BELLO G ET AL. High dose tigecycline in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria. *Crit Care* 2014, 18:R90
- Corresponding author:*
- J. Meletiadis, Clinical Microbiology Laboratory, “Attikon” University General Hospital, 1 Rimini street, 124 62 Haidari, Greece
e-mail: jmeletiadis@med.uoa.gr