Juliana Januário Gaudereto

**Comparação de métodos para detecção de sinergismo *in vitro* de antibióticos
contra bactérias Gram-negativas multirresistentes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gaudereto, Juliana Januário
Comparação de métodos para detecção de sinergismo
in vitro de antibióticos contra bactérias Gram-
negativas multirresistentes / Juliana Januário
Gaudereto. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Sinergismo farmacológico
2.Resistência microbiana a medicamentos
3.Acinetobacter baumannii 4.Pseudomonas aeruginosa
5.Serratia marcescens 6.Carbapenêmicos

USP/FM/DBD-387/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Gilmar e Neuza, e o meu irmão Gabriel, pelo apoio e amor que guiaram o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida e por colocar força em meu coração para superar as dificuldades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Investigação Médica 54 (LIM-54), funcionários, ex-funcionários, alunos, ex-alunos e estagiários pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

À Dra. Gleice Cristina Leite, pelos ensinamentos, colaboração e incentivo.

Ao Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto pelos ensinamentos, colaboração e apoio.

À Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins pela colaboração e pela disponibilidade em todos os momentos em que foi solicitada.

Às alunas Ana Paula Marchi Rosin e Michele Medeiros, pelos conselhos, pela ajuda e incentivo.

À amiga Andréia Alcaia, pelos conselhos, incentivos e ajuda.

À Roseli Santos, pelo suporte e auxílio acadêmico durante a execução deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, força e amor incondicional. Sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Ao meu companheiro Haroldo, pelos conselhos, pela paciência e incentivos nos momentos de angústia.

Aos meus amigos, pelo apoio e por entenderem a minha ausência.

“Não se pode criar experiência. É preciso passar por ela”.

(Albert Camus)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica - 54 da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o auxílio financeiro ao aluno do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de quadros	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Resumo	
Abstract	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1 Resistência aos β - lactâmicos em <i>P. aeruginosa</i>	3
1.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	6
1.2.1 Resistência aos β - lactâmicos em <i>A. baumannii</i>	6
1.3 <i>Serratia marcescens</i>	7
1.3.1 Resistência aos β - lactâmicos em <i>S. marcescens</i>	8
1.4 Métodos de sinergismo <i>in vitro</i>	9
1.4.1 <i>Time-kill</i>	9
1.4.2 <i>Checkerboard</i>	10
1.4.3 Disco aproximação	10
1.4.4 Teste epsilométrico	12
1.5 Combinações de antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas	13
1.6 Justificativa do estudo	16
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Isolados bacterianos	21
3.2 Cultivo e armazenamento	26
3.3 Cepas controle	26
3.4 Antimicrobianos usados no estudo	26
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima	27
3.5.1 Preparo da microdiluição em placa	27
3.5.2 Preparo da suspensão bacteriana	28
3.5.3 Inoculação da suspensão bacteriana	28
3.5.4 Leitura das concentrações inibitórias mínimas	28
3.6 Sensititre®	28
3.6.1 Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas	29
3.6.2 Leitura das concentrações inibitórias mínimas	29

3.7 <i>Time –kill</i> (Curva de morte)	29
3.7.1 Preparo do método de <i>time-kill</i>	29
3.7.2 Interpretação do <i>time-kill</i>	30
3.8 Disco aproximação	30
3.8.1 Preparo do teste de disco aproximação	31
3.8.2 Interpretação do teste de disco aproximação.....	31
3.9 CIM:CIM Razão	31
3.9.1 Determinação do tempo de difusão do antimicrobino no ágar	31
3.9.2 Preparo do teste CIM:CIM razão.....	32
3.9.3 Interpretação do teste de CIM:CIM razão	32
3.10 Análises dos resultados dos testes de sinergismo	33
3.10.1 Tipos de erros de interpretação.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Isolados bacterianos.....	35
4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	35
4.3 Resultados do método <i>time-kill</i>	36
4.4 Resultados do método disco aproximação	40
4.5 Resultados do método CIM:CIM razão.....	45
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação de β -lactamases segundo Bush e Jacoby (2010).....	4
Quadro 2.	Cepas controle ATCC utilizadas nos experimentos.....	26
Quadro 3.	Tipos de erros de interpretação encontrados nos testes de sinergismo.....	33

.
.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Informações dos 20 isolados de <i>A. baumannii</i> selecionados para o estudo.....	22
Tabela 2.	Informações dos 28 isolados de <i>P. aeruginosa</i> selecionados para o estudo.....	23
Tabela 3.	Informações dos 14 isolados de <i>S.marcescens</i> selecionados para o estudo.....	25
Tabela 4.	Determinação da CIM ₅₀ e CIM ₉₀ para 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores.....	36
Tabela 5.	Resultados da interação de ceftazidima-avibactam com meropenem para 21 isolados do estudo.....	39
Tabela 6.	Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e <i>time-kill</i> para os 13 isolados de <i>A. baumannii</i> sensíveis a colistina e os 7 isolados resistentes.....	41
Tabela 7.	Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e <i>time-kill</i> para os 28 isolados de <i>P. aeruginosa</i>	42
Tabela 8.	Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e <i>time-kill</i> para os 14 isolados de <i>S. marcescens</i>	43
Tabela 9.	Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores de acordo com os métodos de disco aproximação e <i>time-kill</i>	44
Tabela 10.	Resultados dos métodos CIM:CIM razão e <i>time-kill</i> (1XCIM) para os 13 isolados de <i>A. baumannii</i> sensíveis a colistina e os 7 isolados resistentes.....	46
Tabela 11.	Resultados dos métodos CIM:CIM razão e <i>time-kill</i> (1XCIM) para os 28 isolados de <i>P. aeruginosa</i> para comparação.....	47
Tabela 12.	Resultados dos métodos CIM:CIM razão e <i>time-kill</i> (1XCIM) para os 14 isolados de <i>S. marcescens</i> para comparação.....	48

Tabela 13.	Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores de acordo com os métodos CIM:CIM razão e <i>time-kill</i>	49
Tabela 14.	Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 7 isolados de <i>A. baumannii</i> resistentes a colistina de acordo com os métodos disco aproximação, CIM:CIM razão com o <i>time-kill</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Interpretação do teste de disco.....	11
Figura 2.	Método epsilométrico Ângulo de 90°.....	12
Figura 3.	Fluxograma de experimentos realizados no estudo.....	20
Figura 4.	Resultados dos efeitos encontrados pelo método de <i>time-kill</i> para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores do estudo.....	37
Figura 5.	Dinâmica de crescimento em função do tempo de diferentes combinações de antimicrobianos.....	38
Figura 6.	Resultados representativos dos efeitos encontrados no método de disco aproximação.....	45
Figura 7.	Resultados representativos dos efeitos encontrados no método CIM:CIM razão.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AMI	Amicacina
AmpC	β-lactamases da classe C de Ambler
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>arnB</i>	<i>UDP-Ara4O aminotransferase</i>
<i>arnC</i>	<i>Ara4FN transferase</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>bla</i>	Gene codificador de β-lactamases
CAZ	Ceftazidima
CIF	Concentração Inibitória Fracional
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CL	Colistina
Cols	Colaboradores
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
CZA	Ceftazidima-avibactam
ETP	Ertapenem
ESBLs	β-lactamases de espectro estendido
Etest	<i>Epsilometer test</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fosfomicina
GEN	Gentamicina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase

KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolissacarídeo
MBLs	Metallo- β -lactamases
Mer	Meropenem
MHA	Mueller Hinton Ágar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
OXA	Oxacilinase
PBP_s	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SPM	<i>Sao Paulo metallo-β-lactamase</i>
ST	<i>Sequence typing</i>
STG	Sequenciamento total do genoma
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase

RESUMO

Gaudereto JJ. *Comparação de métodos para detecção de sinergismo in vitro de antibióticos contra bactérias Gram-negativas multirresistentes* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Nos últimos anos a incidência de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes aumentou expressivamente. Esse fenômeno não foi acompanhado pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos, resultando em infecções cuja opção de tratamento é a combinação de antimicrobianos. *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), e capazes de adquirir resistência a várias classes de antimicrobianos, como os carbapenêmicos e polimixinas. Os testes que avaliam sinergismo *in vitro* podem ser uma ferramenta importante na escolha do tratamento antibiótico adequado para infecções causadas por microrganismos multirresistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar métodos de sinergismo *in vitro* que possam ser utilizados na rotina de laboratórios de microbiologia clínica como alternativa ao método considerado padrão ouro (*time-kill*). Foram selecionados para o estudo 48 isolados Gram-negativos não fermentadores (20 *A. baumannii* e 28 *P. aeruginosa*) e 14 fermentadores (*S. marcescens*) do banco de cepas do LIM-54 com diferentes mecanismos de resistência identificados por PCR e sequenciamento total do genoma. Foram realizados, concentração inibitória mínima dos antimicrobianos e avaliação do sinergismo pelos métodos *time-kill* (TK), disco aproximação (DA) e CIM:CIM razão. A concordância dos métodos foi avaliada por teste de kappa e os resultados discordantes foram classificados em tipos de erros baseado no FDA. Os isolados apresentaram alta proporção de resistência a meropenem e 7 isolados de *A. baumannii* apresentaram resistência a colistina. A combinação de colistina com fosfomicina ou meropenem apresentou elevado efeito sinérgico para os isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina pelo DA e TK. Por outro lado, a combinação de fosfomicina-meropenem apresentou concordância boa pelo teste de kappa e baixo número de erros entre os métodos TK e DA para todos os isolados de *A. baumannii*. Para os isolados de *P. aeruginosa* não foram detectados efeitos sinérgicos pelos métodos DA e CIM:CIM razão. O método

CIM:CIM razão apresentou alta concordância com o TK entre os isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina. A combinação ceftazidima-avibactam com meropenem apresentou elevado efeito sinérgico para os isolados de *S. marcescens* portadores do gene *bla_{KPC-2}* pelo DA e TK. O método de DA apresentou uma boa correlação com o TK para a combinação de fosfomicina-meropenem e ceftazidima-avibactam-meropenem, com baixa porcentagem de erros menores, podendo ser utilizado para avaliar sinergismo *in vitro* para essas combinações. Não foi identificado no estudo efeito antagônico, portanto, foram encontrados somente erros menores.

Descritores: sinergismo farmacológico; resistência microbiana a medicamentos; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serratia marcescens*; carbapenêmicos.

ABSTRACT

Gaudereto JJ. *Comparison of methods for detection in vitro synergism antibiotics of multiresistant Gram-negative bacteria* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

In recent years, the incidence of infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria has increased. This event has not been accompanied by the development of new antimicrobials, resulting in infections which treatment option is the combination of antimicrobials. *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* are important causes of Hospital Acquired Infection (HAI), and able to acquire resistance to multiple classes of antimicrobials, such as carbapenems and polymyxins. Synergism testing may be an important tool to choose the appropriate antibiotic treatment. The aim of this study was to evaluate *in vitro* synergism methods that can be used in a clinical microbiology laboratory as an alternative to the method considered the gold standard (time-kill). For the study were selected 48 non-fermenting (20 *A. baumannii* and 28 *P. aeruginosa*) and 14 fermenting (*S. marcescens*) Gram-negative isolates from LIM-54 strains bench with different resistance mechanisms identified by PCR and total genome sequencing. Minimum antimicrobial inhibitory concentration and synergism evaluation by time-kill (TK), disk approximation (DA) and MIC: MIC ratio were performed. Agreement of the methods was evaluated by kappa test and the discordant results were classified in types of errors based on the FDA. The isolates showed high proportion of resistant to meropenem and 7 *A. baumannii* isolates showed resistance to colistin. The combination of colistin with fosfomycin or meropenem showed high synergistic effect for colistin-resistant *A. baumannii* isolates by DA and TK. On the other hand, the combination of fosfomycin-meropenem showed good concordance by kappa test and low number of errors between TK and DA for all *A. baumannii* isolates. For *P. aeruginosa* isolates no synergistic effects were detected by DA and MIC: MIC ratio. The method MIC: MIC ratio showed high concordance with the TK among the colistin-resistant *A. baumannii* isolates. The combination ceftazidime-avibactam with meropenem showed high synergistic effect for the isolates of *S. marcescens* carrying *bla*_{KPC-2} gene by DA and TK. The DA showed a good agreement

with TK for the combination of fosfomycin-meropenem and ceftazidime-avibactam-meropenem, with a low percentage of minor errors, and could be used to evaluate synergism *in vitro* for these combinations.

Descriptors: drug synergism; drug resistance, microbial; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonasaeruginosa*; *Serratia marcescens*; carbapenems.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento constante dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e a disseminação desses mecanismos entre as bactérias são reconhecidos como um dos principais desafios para a saúde pública no mundo (Tang et al., 2014). Esse fenômeno não foi acompanhado pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos, principalmente para bactérias Gram-negativas, resultando em infecções sem opção terapêutica (Souli et al., 2008).

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* Enterobacteriaceae são organismos frequentes em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo e que podem adquirir resistência a várias classes de antimicrobianos (Marra et al., 2011; Magiorakos et al., 2012).

De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, bactérias Gram-negativas foram mais prevalentes em infecções de corrente sanguínea em UTI adulto em 2016, *Klebsiella pneumoniae* (19%), seguido *A. baumannii* (12%), *P. aeruginosa* (7%) e os isolados *Serratia* spp. em (2%) (CVE, 2016).

Serratia marcescens tem sido considerada um importante causador de infecções nosocomiais oportunistas (Mahlen, 2011). Apesar de menos frequente quando comparada com outras enterobactérias, a espécie possui resistência intrínseca a vários grupos de antimicrobianos, inclusive a classe das polimixinas. Estudos têm reportado a aquisição de genes de resistência a carbapenêmicos nessa espécie (Silva et al., 2015; Moradigaravand et al., 2016; Cayô et al., 2017). A disseminação de cepas de *S. marcescens* multirresistentes é preocupante, pois o tratamento para infecções causadas por esta bactéria pode ser difícil no futuro (Moradigaravand et al., 2016).

Segundo a Anvisa, 85% dos isolados de *Acinetobacter* spp. e 43% dos isolados de *P. aeruginosa* provenientes de Infecção de Corrente Sanguínea primária de pacientes adultos internados em UTIs no Brasil foram resistentes aos carbapenêmicos no ano de 2016 (Anvisa, 2016).

A colistina tem sido utilizada como droga de escolha no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos. No entanto, o surgimento de resistência a colistina tornou o uso da terapia combinada necessária (Nastro et al., 2014).

Na última década, vários países descreveram surtos e infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes, com alta mortalidade cuja opção de tratamento é a combinação de antimicrobianos (Soporila et al., 2010; Pournaraset al., 2011; Marra et al., 2011; Gales et al., 2012; Rossi et al., 2017).

Atualmente, as bactérias podem ser classificadas como multirresistentes (MR) quando apresentam resistência a um agente em três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012), ou quando apresentam resistência a um antimicrobiano chave (Siegel et al., 2007). A resistência a carbapenênicos em bactérias Gram-negativas pode ser um bom marcador para o fenótipo de MR, pois é comum encontrar nestes organismos a resistência a outras classes de antimicrobianos (Souli et al., 2008).

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador, móvel, aeróbio e encontrado em diversos ambientes. Este agente é considerado um patógeno oportunista e de difícil eliminação devido a vários fatores de virulência e a resistência natural e adquirida a muitos antimicrobianos (Livermore, 2002; Trabulsi; Alterthum, 2008). A espécie pode causar infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística, infecções urinárias, infecções de pele e bacteremia (Trabulsi; Alterthum, 2008; Kresken et al., 2011).

1.1.1 Resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa*

A produção de β -lactamases é um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. As β -lactamases foram classificadas por Ambler (1980) de acordo com a sua estrutura molecular em quatro classes (A a D). Posteriormente, Bush, Jacoby e Medeiros (1995) classificaram as enzimas de acordo com o seu substrato e perfis de inibição por inibidores de β -lactamases. Bush e Jacoby (2010) fizeram a correlação entre essas duas classificações, como apresentado no quadro 1.

Quadro 1. Classificação de β -lactamases segundo Bush e Jacoby (2010).

Bush-Jacoby grupo (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros grupo (1995)	Classe molecular	Substrato	Inibição	
				AC ou TZB	EDTA
1	1	C	cefalosporinas	Não	Não
1e	NI	C	cefalosporinas	Não	Não
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não
2b	2b	A	penicilinas, cefalosporinas	Sim	Não
2be	2be	A	cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Sim	Não
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não
2ber	NI	A	cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Não	Não
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não
2ce	NI	A	carbenicilina, cefepime	Sim	Não
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não
2de	NI	D	cefalosporinas espectro estendido	Variável	Não
2df	NI	D	carbapenêmicos	Variável	Não
2e	2e	A	cefalosporinas espectro estendido	Sim	Não
2f	2f	A	carbapenêmicos	Variável	Não
3a	3	B (B1)	carbapenêmicos	Não	Sim
-	-	B (B3)	carbapenêmicos	-	-
3b	3	B (B2)	carbapenêmicos	Não	Sim
NI	4	DE	-	-	-

AC: ácido clavulânico; TZB: tazobactam; NI: não incluída; DE: desconhecido

Os isolados de *P.aeruginosa* podem apresentar resistência a diversos agentes β -lactâmicos. É crescente, entretanto a preocupação do aumento da resistência aos carbapenêmicos considerados uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por Gram-negativos. Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos incluem enzimas, alteração de proteínas de membrana externa denominada porinas e bombas de efluxo (Ruppé et al., 2015).

As enzimas carbapenemases da classe B de Ambler (MBLs) são frequentemente responsáveis pela resistência a carbapenêmicos em *P. aeruginosa* (Castanheira et al., 2014). Essas enzimas degradam todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam, abrangendo as associações com inibidores comerciais de β -lactamases (Queenan, Bush, 2007). No entanto, a enzima serino carbapenemase KPC, da classe A de Ambler também foi reportada na espécie (Villegas et al.,2007).

No Brasil, isolados produtores de MBLs são responsáveis pelos elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos. Cepas de *P. aeruginosa* produtoras de enzimas do tipo IMP (*imipenem*), VIM(*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) e SPM (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*), tem sido reportada, sendo a última responsável por elevadas taxas de mortalidade e que parece ser endêmica no país (Gales et al.,2003; Zavascki et al.,2006; Neves et al.,2011).

Os isolados de *P. aeruginosa* podem apresentar resistência aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem devido perda ou mutação de uma porina externa denominada OprD (Woodford et al., 2011). As alterações na permeabilidade da membrana externa podem limitar o acesso dos antimicrobianos para o espaço intracelular (Gales et al.,2003).

As bombas de efluxo podem exportar para o meio externo várias classes de antimicrobianos. O complexo de bomba de efluxo MexAB-OprM confere aumento das concentrações inibitórias mínimas de penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro, tetraciclinas, fluoroquinolonas e carbapenêmico (Livermore, 2002; Ruppé et al., 2015). Os sistemas MexCD-OprJ e MexEF-OprN estão relacionados ao aumento de resistência para as fluoroquinolonas e alguns β -lactâmicos (Livermore, 2002).

1.2 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii faz parte do grupo de cocobacilos Gram-negativos não fermentadores, são imóveis, aeróbios estritos e oxidase negativa (Konemann et al., 2008). O microrganismo está amplamente distribuído no ambiente hospitalar, sendo muito eficaz em colonizar seres humanos. As cepas de *A. baumannii* são uma importante causa de infecções adquiridas nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), principalmente, infecções do trato respiratório e infecções de corrente sanguínea (Konemann et al., 2008).

O interesse por esse microrganismo aumentou nas últimas décadas devido a sua capacidade em adquirir novos mecanismos de resistência, causar surto nosocomial e apresentar resistência a última linha de antimicrobianos, como os carbapenêmicos e as polimixinas (Peleg et al., 2008).

1.2.1 Resistência aos β -lactâmicos em *A. baumannii*

A rápida disseminação mundial de *A. baumannii* resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos mostra o potencial de adaptação deste microrganismo à pressão ambiental (Peleg et al., 2008; Gales et al., 2012).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) pertencem à classe molecular A e conferem resistência as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam. Não hidrolizam cefamicinas e carbapenêmicos e são inibidas por ácido clavulânico (Peleg et al., 2008).

As ESBLs foram encontradas em cepas de *A. baumannii*, mas a sua frequência pode não ser relatada devido à dificuldade do diagnóstico laboratorial fenotípico, principalmente pela produção intrínseca de cefalosporinase do tipo AmpC na espécie (Bou; Martinez-Beltran, 2000; Peleg et al., 2008).

A hidrólise enzimática mediada por carbapenemases é um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos. Cepas de *A. baumannii* produtoras de MBLs do tipo VIM, IMP, SIM e, recentemente, NDM foram descritas em todo o mundo (Potron et al., 2015). As enzimas do tipo OXA pertencem à classe D de Ambler e são comuns nesta espécie (Opazo et al., 2012). Estas enzimas são capazes de hidrolisar oxacilina e carbapenêmicos (Poirel; Nordmann, 2006), e estão

distribuídas amplamente, porém não são as únicas responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (Higgins et al., 2009). Outros mecanismos podem estar envolvidos, como a perda de porinas ou alterações de proteínas de ligação a penicilinas (PBPs) (Bou et al., 2000; Poirel; Nordmann, 2006; Peleg et al., 2008).

Atualmente, são encontrados cinco subgrupos principais de oxacilinases em *A. baumannii*: OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143-like (Opazo et al., 2012; Gales et al., 2012; Mostachio et al., 2012). O subgrupo OXA-51 é intrínseco em *A. baumannii* (Peleg et al., 2008). O grupo OXA-143 foi reportado em isolados *A. baumannii* multirresistentes no Brasil (Higgins et al., 2009). Essa oxacilinase pode conferir alto nível de resistência a carbapenêmicos quando associada a outros mecanismos de resistência (Evans, Amyes, 2014).

Um estudo realizado no HC-FMUSP mostrou alta predominância de cepas de *A. baumannii* produtora de OXA-143. Também foi observado no estudo, ausência ou diminuição das proteínas CarO (29kDa), proteínas de 33-36kDa e 43kDa na maioria dos isolados. A presença de OXA-143 e alterações em proteínas de membrana externa (OMP) ou porinas podem estar relacionadas à elevada taxa de resistência a carbapenêmicos (Mostachio et al., 2012).

O grupo OXA-23 foi o primeiro grupo do tipo OXA que confere resistência a carbapenêmicos identificado em *A. baumannii* (Evans, Amyes, 2014). A produção dessa enzima é suficiente para conferir resistência a carbapenêmicos e pode ser transmitida por plasmídeos (Opazo et al., 2012). Estudo demonstrou que o gene *bla*_{OXA-23-like} está amplamente distribuído no Brasil. A maioria (92,2%) dos isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos investigados no estudo eram positivos para o gene *bla*_{OXA-23-like} (Chagas et al., 2014).

1.3 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens é um microrganismo Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae, capaz produzir as enzimas hidrolíticas lipase, gelatinase e DNase (Konemann et al., 2008). Pode causar infecções oportunistas, principalmente surtos associados a isolados multirresistentes (Merkier et al., 2013). A bactéria é pouco estudada quando comparada com outras espécies da família devido ao seu reconhecimento recente como uma espécie patogênica (Moradigaravand et al., 2016).

Pode ser encontrada na água, solo, plantas, insetos e animais (Mahlen, 2011). Em seres humanos está associada à diversas infecções, como no trato urinário, trato respiratório e corrente sanguínea (Trabulsi; Alterthum, 2008; Mahlen, 2011).

As infecções nosocomiais causadas por esse microrganismo possuem elevada taxa de mortalidade e a espécie é naturalmente resistente a vários antimicrobianos, como a polimixinas (Merkieret al., 2013). O surgimento de isolados multirresistentes é um problema de saúde pública (Moradigaravand et al., 2016).

1.3.1 Resistência aos β -lactâmicos em *S. marcescens*

S. marcescens apresentam o gene AmpC cromossômico, que confere resistência à cefalosporinas, e foram descritas cepas que adquiriram plasmídeos de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (Mahlen, 2011; Merkieret al., 2013).

Os carbapenêmicos são utilizados no tratamento de infecções causadas por isolados produtores de ESBLs. As espécies do gênero *Serratia* são geralmente sensíveis a carbapenêmicos, entretanto, foram identificados isolados da espécie *S. marcescens* com carbapenemases codificadas por cromossomo (Mahlen, 2011). Essa carbapenemase denominada SME-1 foi descrita pela primeira vez em um isolado de *S. marcescens* na Inglaterra em 1982 que apresentava resistência ao imipenem e sensibilidade reduzida ao meropenem (Yang et al., 1990). Foram encontradas outras variantes desta enzima em pequenos surtos, no qual foram denominadas SME-2 e SME-3 (Queenan; Bush, 2007; Mahlen, 2011). Recentemente, um estudo reportou uma nova variante da enzima SME-4 em uma cepa de *S. marcescens* isolada de um paciente com sepsi no Brasil (Cayô et al., 2017).

Outra enzima frequente em cepas resistentes a carbapenêmicos de Enterobacteriaceae é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), a enzima é encontrada em plasmídeos e hidrolisa todas as classes de antimicrobianos β -lactâmicos (Queenan; Bush, 2007; Woodford et al., 2011). Estudos conduzidos em diferentes locais identificaram enzimas do tipo KPC em isolados de *S. marcescens* (Deshpande et al., 2006; Silva et al., 2015).

Um estudo realizado em um hospital universitário brasileiro no período de 2011 a 2013 identificou cepas de *S. marcescens*, provenientes de um surto,

produtoras de KPC-2 e IMP-10, simultaneamente. A presença de ambas carbapenemases na espécie é preocupante, uma vez que limita as opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções (Silva et al.,2015).

1.4 Métodos de sinergismo *in vitro*

A combinação de antimicrobianos tem se tornado a única alternativa no tratamento de infecções causadas por bactérias MR. Neste cenário, metodologias que avaliam o sinergismo *in vitro* têm sido estudadas.

Apesar das diferenças entre os testes experimentais, existe um consenso geral sobre a interpretação dos resultados da interação entre os antimicrobianos. O sinergismo ocorre quando o efeito combinado dos antimicrobianos tem um resultado superior do que o efeito encontrado com os antimicrobianos quando usados separadamente; o antagonismo ocorre quando o resultado dos antimicrobianos combinados é inferior ao resultado encontrado quando são usados separadamente; e o indiferente ocorre quando os antimicrobianos não interagem entre si, sendo encontrado como resultado o efeito do antimicrobiano mais ativo (Pillai et al., 2005).

Os métodos de *time-kille checkerboards* são os mais utilizados para determinar sinergia, porém são testes demorados e exigentes tecnicamente (White et al.,1996; Bonapace et al.,2000). Quando comparados apresentam discordância de resultados. Uma possível explicação para este fato é que ambos avaliam eventos diferentes, o método *checkerboard* determina a atividade inibidora enquanto o método *time-kill* a atividade bactericida (White et al.,1996).No entanto, ambos podem ser utilizados como referência para novos métodos (Bonapace et al.,2000;Pankey et al.,2013).

Uma técnica de detecção de sinergismo *in vitro* simples de realizar, reprodutível e com potencial para ser utilizada na rotina clínica seria uma importante contribuição para os métodos de detecção de sinergismo (Bonapace et al.,2000).

1.4.1 Time-kill

O método de *time-kill* mede a atividade bactericida da combinação de antimicrobianos testada em função do tempo, sendo considerado um método relevante para situações clínicas, onde a terapia bactericida é desejável (Pillai et al., 2005).

No teste de *time-kill*, a ação dos antimicrobianos combinados ou sozinhos é avaliada em tempos determinados. Os tubos contendo o microrganismo, os antimicrobianos e o meio de cultura são incubados a 36 °C. Alíquotas são removidas e semeadas, após diluições seriadas, em placas de meio de cultura (sem antimicrobiano) para contagem de colônias viáveis. O método tem sido utilizado como padrão ouro para os testes de sinergia, pois a contagem de colônias em tempos determinados pode proporcionar melhor entendimento da interação entre os antimicrobianos (Bonapace et al., 2000; Pillai et al., 2005). Estudos sugerem que o método de *time-kill* é mais sensível para detectar sinergismo do que o método de *checkerboard* (Sheng et al., 2011; Tan et al., 2011; Leite et al., 2015).

As desvantagens da técnica são o tempo longo para obter os resultados, sendo necessários quatro dias seguidos, e o trabalho na execução do teste que exige contagem de colônias em placas (Pankey et al., 2013).

1.4.2 Checkerboard

A técnica de tabuleiro, conhecida como *checkerboard*, consiste em múltiplas diluições de dois antimicrobianos em placas de microtitulação. Os antimicrobianos são aplicados em concentrações iguais, acima e abaixo das suas CIMs contra o organismo testado (Pillai et al., 2005). Para interpretação do teste é utilizado um cálculo matemático para determinação do efeito da combinação (Bonapace et al., 2000).

Uma vantagem do método é a possibilidade de testar várias concentrações diferentes dos antimicrobianos, porém são fornecidos apenas dados da atividade inibitória e não bactericida da combinação (Pillai et al., 2005).

1.4.3 Disco aproximação

A metodologia segue o mesmo padrão do teste de sensibilidade em ágar Mueller Hinton e fornece dados sobre a interação entre os antimicrobianos (Montanari et al., 2005).

Os discos impregnados com os antimicrobianos são colocados em uma placa semeada com o organismo teste. Os discos são dispostos em uma distância variável, geralmente é utilizada uma distância igual ou maior do que a soma dos raios de inibição dos antimicrobianos quando avaliados separadamente (Pillai et al., 2005). A sinergia é definida como positiva quando ocorre a formação de uma ponte próxima da junção das duas zonas de inibição ou uma zona fantasma; em combinações indiferentes são formadas duas zonas de inibição independentes ao redor dos discos e em interações antagônicas ocorre uma distorção do halo de inibição entre os discos (Pillai et al., 2005). A figura 1 ilustra as definições mencionadas acima.

Fonte: Pillai et al. (2005).

Figura 1. Interpretação do teste de disco.

Uma desvantagem do método é que o gradiente produzido na difusão dos antimicrobianos não tem uma correlação clara com as concentrações alcançáveis, mas os dados qualitativos podem ser úteis para triagem de sinergia (Pillai et al., 2005). Outro benefício da técnica é sua fácil execução, sendo possível sua aplicação em laboratórios clínicos de microbiologia.

Um estudo recente avaliou a atividade *in vitro* de plazomicina com outros antimicrobianos contra isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos. Efeito sinérgico foi observado para as combinações com meropenem e imipenem pelos métodos de disco difusão, *checkerboard* e *time-kill*. (García-Salguero et al., 2015).

Pesquisas avaliando a metodologia de disco-difusão para detecção de sinergismo *in vitro* são importantes, pois a técnica pode ser facilmente utilizada em laboratórios clínicos convencionais.

1.4.4 Teste epsilométrico

As fitas epsilométricas podem ser utilizadas para identificação de sinergismo. Os métodos descritos na literatura são relativamente simples e utilizam padrão semelhante ao teste de disco-difusão.

Na metodologia do Ângulo de 90°, descrita por White e cols (1996), as tiras com os antimicrobianos são colocadas em uma placa de MHA, semeada com o organismo teste, formando um ângulo de 90° entre as escalas das CIMs dos antimicrobianos. Após a incubação por 18 horas é realizada a leitura da CIMs dos antimicrobianos em combinação, conforme demonstrado na figura 2.

Fonte: White et al. (1996)

Figura 2. Método epsilométrico Ângulo de 90°.

No método de razão fixa (*fixed ratio method*), as tiras com os antimicrobianos A e B são colocadas em locais diferentes da placa de MHA, previamente semeada

com o inóculo. Após uma hora em temperatura ambiente as tiras são removidas. Uma nova tira do segundo antimicrobiano é colocada sobre o gradiente do primeiro. O mesmo procedimento é realizado para o outro antimicrobiano (Sopirala et al., 2010). A CIM é determinada na interseção da tira onde ocorreu a inibição do crescimento bacteriano.

Outro método semelhante foi descrito por Pankey e Ashcraft (2005). Neste método, as tiras dos antimicrobianos são colocadas alinhando a CIM de ambos. A CIM de cada antimicrobiano (A e B), previamente determinada, é marcada no ágar. As tiras são removidas e descartadas. Uma nova tira do antimicrobiano (A ou B) é colocada sobre o gradiente da tira anterior, alinhando a CIM da primeira tira com a segunda tira.

Para avaliar o efeito das combinações de antimicrobianos pelos testes epsilométricos é realizado o cálculo da concentração inibitória fracional (CIF) usando a seguinte fórmula: $CIFA + CIFB = CIF$, onde CIFA é a CIM do antimicrobiano A em combinação dividido pela CIM do antimicrobiano A sozinho e o CIFB é a CIM do antimicrobiano B em combinação dividido pela CIM do antimicrobiano B sozinho (Bonapace et al., 2000). Efeito sinérgico é considerado com $CIF \leq 0,5$ (Sopirala et al., 2010).

Estudos têm investigado os testes epsilométricos para avaliação de sinergismo (White et al., 1996; Bonapace et al., 2000; Tan et al., 2011; Sopirala et al., 2010). Um estudo recente comparou os métodos epsilométrico CIM: CIM razão (do inglês MIC: MIC ratio), Razão fixa (do inglês fixed ratio) e Ângulo de 90° (do inglês 90° Angle) com o método *time-kill* contra 31 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase. Dos três métodos avaliados, o CIM: CIM razão apresentou melhor correlação com o *time-kill* com uma concordância de 80,6% e um kappa significativo de 0,59; $P < 0,001$ (Pankey et al., 2013).

1.5 Combinações de antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas

A combinação de antimicrobianos pode ser utilizada no tratamento de infecções causadas por organismos multirresistentes, com o objetivo de sinergia ou para prevenir o desenvolvimento de resistência ao antimicrobiano ativo adicionando um antimicrobiano inativo (Rahal, 2006). A utilização de dois ou mais agentes

antimicrobianos contra quais as bactérias desenvolvem resistência por mecanismos distintos, diminui a probabilidade de emergir cepas com resistência a todos os agentes empregados (Pillai et al., 2005). Outro benefício da associação de dois agentes seria diminuir a toxicidade ao utilizar doses mais baixas dos antimicrobianos (Rahal, 2006).

A terapia com polimixinas surgiu como uma alternativa no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. No entanto, falhas com monoterapia e o aumento de resistência levaram a pesquisas com terapia combinada com polimixinas, com o propósito de matar microrganismos sensíveis e resistentes a essa classe de antimicrobiano (Lenhard et al., 2016). Acredita-se, que as polimixinas provocam rápida permeabilização das membranas, aumentando a atividade de outros antimicrobianos (Timurkaynak et al., 2006).

Mitsuguia e cols (2011) estudaram o efeito sinérgico *in vitro* de polimixinas com β -lactâmicos contra 34 isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa*. Foi observado efeito indiferente pelo método de *checkerboard* para todos os isolados, mas houve redução da CIMs dos β -lactâmicos quando combinados com polimixinas. Outro estudo detectou efeito sinérgico de colistina com imipenem e imipenem com tigeciclina contra isolados clínicos de *A. baumannii* pan-resistentes por diferentes métodos *in vitro* (Sopirala et al., 2010).

Pankey e Ashcraft (2011) avaliaram a atividade *in vitro* de polimixina B com meropenem e rifampicina contra 14 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases. Efeito sinérgico de polimixina B com meropenem foi encontrado em 43% dos isolados pelo método de Etest e em 64% pelo método *time-kill*. Já para combinação de polimixina B com rifampicina foi detectado 21% efeito sinérgico pelo método Etest e 100% pelo *time-kill*. Outro estudo avaliou efeito sinérgico de polimixina B e outros antimicrobianos contra isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, com diferentes mecanismos de resistência a carbapenêmicos pela técnica de *time-kill*. Efeito bactericida foi observado em 30% com polimixina B e doripenem, 30% doripenem com rifampicina e 25% polimixina B com rifampicina. Não foi observado efeito bactericida com os antimicrobianos separados (Urban et al., 2010).

Estudos *in vitro* apontam altas taxas de sinergismo com a combinação de polimixinas com carbapenêmicos (Zusman et al., 2013). Sinergismo também foi

observado em combinações contendo colistinapara isolados resistentes a colistina(Gaibani et al.,2014).

Um estudo de coorte avaliou a terapia combinada ou monoterapiacom polimixina B, em unidades de terapia intensiva de hospitais de ensino, contra infecções graves causadas por *A. baumannii* ou *P. aeruginosa*. A combinação de polimixina B com um carbapenêmico, sem atividade *in vitro*, diminuiu o risco de mortalidade entre os pacientes graves infectados com isolados extensivamente resistentes (Rigatto et al., 2015).

A fosfomicinaé outro antimicrobiano que pode ser utilizado como alternativa no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (Perdigão-Neto et al,2013). Um estudo com 94 pacientes infectados com *A.baumannii* resistentes a carbapenêmicos observou uma melhora microbiológica favorável e menor mortalidade para os pacientes que receberam terapia combinada de colistina com fosfomicina (Sirijatuphat; Thamlikitkul, 2014). Portanto, estudos *in vitro*e *in vivo*que avaliam sinergismo de fosfomicinacom outros antimicrobianos são importantes.

A associação de dois antimicrobianos carbapenêmicos, ertapenem com doripenem ou meropenem, tem mostrado resultados favoráveis contra isoladosprodutores de *Klebsiellapneumoniae*carbapenemases (KPC)(Giamarellouet al.,2013;Cprek; Gallagher, 2016; Oliva et al.,2017).Oertapenem com sua maior afinidade para as carbapenemases atuaria como substrato suicida, permitindo que o outro antimicrobiano exerça sua função(Bulik; Nicolau, 2011). Estudos *in vitro*e relatos de casos mostram resultados promissores com a combinação no tratamento de infecções causadas por isolados de *Klebsiellapneumoniae*produtor de KPC, porém os dados publicados são limitados (Bulik; Nicolau, 2011; Giamarellouet al.,2013; Cprek; Gallagher, 2016).

Uma nova combinação com inibidor de β -lactamase foi aprovada para o tratamento de infecções graves causadas por Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (Temkin et al., 2016). Ceftazidima-avibactam (CZA) tem atividade contra enzimas da classe A de Ambler, classe C e algumas da classe D (Zhanel et al., 2013). A terapia combinada tem sido indicada quando se faz o uso de CZA no tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, mas existem poucos estudos avaliando essa associação (Gaibani et al.,2017).

Estudo recente avaliou a atividade *in vitro* de CZA com diferentes antimicrobianos (ertapenem, imipenem, meropenem, gentamicina, tigeciclina e ciprofloxacina). O efeito sinérgico foi mais frequente para as combinações com meropenem e imipenem (Gaibani et al.,2017).

1.6 Justificativa do estudo

A resistência aos antimicrobianos aumentou nas últimas décadas e a escolha da droga para o tratamento dessas infecções está se tornando cada vez mais difícil. Bactérias Gram-negativas são importantes patógenos causadores de infecções hospitalares e possuem mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos. A combinação de antimicrobianos pode ser uma alternativa no tratamento dessas infecções, principalmente as causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. O teste de sinergismo pode ser uma ferramenta importante na escolha da terapia adequada para o tratamento de infecções causadas por isolados multirresistentes, exigindo assim estudos para validação dessas técnicas *in vitro* para utilizar em laboratórios de microbiologia clínica.

2. OBJETIVOS

O objetivo do estudo é avaliar métodos de sinergismo *in vitro* que possam ser utilizados em um laboratório de microbiologia clínica, como alternativa ao método de *time-kill*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O presente trabalho, embora não se aplique o termo de consentimento, não divulgará a identidade dos pacientes ou quaisquer informações que poderão identificá-los, estas informações serão mantidas em sigilo.

A figura 3 descreve o fluxograma de trabalho realizado durante o estudo.

Figura 3. Fluxograma de experimentos realizados no estudo.

3.1 Isolados bacterianos

Foram selecionados para o estudo 62 isolados, obtidos da coleção de cepas do Laboratório de Investigação Médica - 54 (LIM54) do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Todos os isolados foram provenientes de amostras clínicas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Entre eles 20 *A. baumannii* coletados no período de 2002 a 2012, 28 *P. aeruginosa* no período de 2011 a 2013 e 14 *S. marcescens* no período de 2010 a 2013.

As cepas foram selecionadas com base no perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência caracterizados em estudos anteriores (Leite, 2016; Chaves et al., 2017). As tabelas 1,2 e 3 apresentam informações prévias dos isolados selecionados para o estudo. O mecanismo responsável pela resistência a colistina entre sete isolados de *A. baumannii* foi investigado em estudo anterior e está relacionado a mutações e superexpressão dos genes do sistema regulatório PmrCAB (Leite, 2016).

Tabela 1. Informações dos 20 isolados de *A. baumannii* selecionados para o estudo.

ID	Ano*	Material	Local	Perfil Clonal (PFGE)	Genes de resistência identificados por PCR e STG	ST	CIM (µg/mL)			
							CL	Mer	AMI	**FOS
1	2002	Sangue	E1MH	G	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>aacA4</i> , <i>aac(6')</i> -31, <i>aadA1</i> , <i>fosA</i> , <i>aac(6')</i> <i>lb-cr</i> , <i>sul1</i>	32	2	64	128	64
2	2002	Sangue	E1MH	E	<i>bla</i> _{OXA-51}	ND	2	128	128	64
3	2003	Sangue	UPSM	F	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>fosA</i> , <i>fosX</i> ,	15	1	128	128	64
4	2003	Sangue	UMIN	E	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>aadB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>	107	2	128	128	64
5	ND	Sangue	EICO	H	<i>bla</i> _{OXA-51}	ND	2	64	64	64
6	2002	Sangue	EPSM	F	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>fosA</i> , <i>fosX</i>	15	1	128	128	128
7	2003	Sangue	ETMO	G1	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{IMP}	ND	0,5	64	128	64
8	2004	Sangue	EMIN	I	<i>bla</i> _{OXA-117} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>fosA</i> , <i>fosX</i>	317	0,5	16	128	64
9	2004	Sangue	EICO	E1	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadB</i> , <i>fosA</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>	107	0,5	32	128	64
10	2004	Sangue	EICO	D	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>bla</i> _{IMP}	ND	0,5	64	128	64
11	2004	Sangue	U1MH	I2	<i>bla</i> _{OXA-51}	ND	0,5	64	128	128
12	2004	Sangue	ECMG	J	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>fosA</i> , <i>fosX</i> ,	317	1	16	256	128
13	2004	Sangue	UQUE	K	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>	107	0,5	128	256	64
14	2011	CVC	E1CH	A1	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-65} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	79	16	32	256	64
15	2012	Swab retal	U1CH	A	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-117} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	79	16	32	256	64
16	2011	CVC	U1CH	A1	<i>bla</i> _{OXA-117} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA1</i>	836	32	32	512	64
17	2011	Sangue	UCNV	A2	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-65} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	79	64	32	512	64
18	2011	Líqu. Ascítico	U1CH	A	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aph(3')</i> -Vla, <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	79	32	32	128	64
19	2012	Sec. traqueal	UNEU	C	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>fosA</i> ,	317	32	16	2	128
20	2011	Sangue	U1CH	B	<i>bla</i> _{OXA-117} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>fosA</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	79	8	16	256	64

ID: identificação dos isolados; *Ano de coleta; CVC: cateter venoso central; STG: Sequenciamento total do genoma; ST: Sequence typing; CL: colistina; Mer: meropenem; AMI: amicacina;

**FOS: fosfomicina (água diluição), ND: não determinado/sem sequenciamento.

Tabela 2. Informações dos 28 isolados de *P. aeruginosa* selecionados para o estudo.

ID	Ano*	Material	Local	Perfil Clonal (PFGE)	Genes de resistência identificados por PCR e STG	ST	CIM (µg/mL)		
							CL	Mer	AMI
1	2012	Sangue	UPSM	D	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>bla_{OXA-56}</i> , <i>aph(3')-IIB</i> , <i>aadA7</i> , <i>rmtD</i> , <i>aacA4</i> , <i>fosA</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>cmx</i> , <i>catB7</i> , <i>sul1</i>	277	0,5	256	512
2	2012	Sangue	UPSM	A	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SPM}</i>	ND	1	256	512
3	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SPM}</i>	ND	0,5	512	4
4	2012	Sangue	E1MH	A	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SPM}</i>	ND	0,5	256	4
5	2012	Sangue	ETMO	E	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-IIB</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i>	1853	0,5	16	2
6	2012	Sangue	ETMO	B	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SPM}</i>	ND	1	512	4
7	2012	Sangue	ETMO	D	<i>bla_{SPM}</i>	ND	1	512	4
8	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{SPM}</i>	ND	1	512	4
9	2012	Sangue	ETMO	A	-	ND	0,5	512	8
10	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{SPM}</i>	ND	0,5	256	512
11	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>bla_{OXA-56}</i> , <i>aph(3')-IIB</i> , <i>aadA7</i> , <i>aacA4</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>cmx</i> , <i>catB8</i>	277	1	256	512
12	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{SPM}</i>	ND	1	512	512
13	2012	Sangue	ETMO	A	<i>bla_{SPM}</i>	ND	1	256	512
14	2012	Sangue	ETMO	C	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>bla_{OXA-56}</i> , <i>aph(3')-IIB</i> , <i>aadA7</i> , <i>rmtD</i> , <i>aacA4</i> , <i>fosA</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>cmx</i> , <i>catB7</i> , <i>sul1</i>	277	0,5	256	512
15	2012	Sangue	ETMO	D	-	ND	0,5	256	512
16	2012	Sangue	ETMO	D	-	ND	1	512	512
17	2013	Sangue	ETMO	D	<i>bla_{SPM}</i>	ND	0,5	256	512
18	2013	Sangue	ETMO	D	<i>bla_{SPM}</i>	ND	0,5	512	512

ID: identificação dos isolados; *Ano de coleta; STG: Sequenciamento total do genoma; ST: Sequence typing; CL: colistina; Mer: meropenem; AMI: amicacina; ND: não determinado/sem sequenciamento.

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 2. Informações dos 28 isolados de *P. aeruginosa* selecionados para o estudo.

ID	Ano*	Material	Local	Perfil Clonal (PFGE)	Genes de resistência identificados por PCR e STG	ST	CIM (µg/mL)		
							CL	Mer	AMI
19	2013	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	1	256	512
20	2013	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{OXA-56} , <i>aph</i> (3')-IIb, <i>aadA7</i> , <i>rmtD</i> , <i>aacA4</i> , <i>fosA</i> , <i>aac</i> (6')Ib-cr, <i>catB7</i> , <i>sul1</i>	277	1	512	512
21	2013	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	1	256	512
22	2013	Sangue	UP4M	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	0,5	256	512
23	2013	Sangue	UP4M	A	-	ND	1	256	512
24	2014	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	0,5	512	8
25	2014	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	0,5	512	4
26	2014	Sangue	ETMO	A	-	ND	0,5	256	256
27	2014	Sangue	E1MH	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	0,5	256	256
28	2014	Sangue	ETMO	A	<i>bla</i> _{SPM}	ND	0,5	512	8

ID: identificação dos isolados; *Ano de coleta; STG: Sequenciamento total do genoma; ST: Sequence typing; CL: colistina; Mer: meropenem; AMI: amicacina; ND: não determinado/sem sequenciamento

Tabela 3. Informações dos 14 isolados de *S.marcescens* selecionados para o estudo.

ID	Ano*	Material	Local	Perfil Clonal (PFGE)	Genes de resistência identificados por PCR e STG	CIM (µg/mL)		
						IMI**	Mer**	AMI**
1	2010	Sangue	ND	B	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>cat</i> (pC194), <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
2	2010	Sangue	ETMO	B	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
3	2011	LABA	UPSM	D	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>cat</i> (pC194), <i>sul2</i>	2	2	>32
4	2011	Urina	UPSM	C	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
5	2011	Urina	UPSM	C	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
6	2011	CVC	UPSM	D	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
7	2010	CVC	U1CH	D	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>bla</i> _{OXA-101} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aadA6</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>cat</i> (pC194), <i>cmx</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA22</i>	<2	<2	>32
8	2012	Sangue	EPSM	B	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>cat</i> (pC194), <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	>8	>8	>32
9	2012	Sangue	UP4M	C	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	<2	<2	32
10	2013	CVC	UPHC	A	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i>	8	2	32
11	2013	Sangue	UP4C	A	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-5} , <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	8	ND	32
12	2013	CVC	UP4M	A	ND	>8	>8	>32
13	2013	Fluído corporal	E2CG	E	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{OXA-101} , <i>aph</i> (3')-Vla, <i>aadA6</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>cmx</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i>	4	ND	16
14	2012	Sangue	UP4M	A	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-5} , <i>aacA4</i> , <i>aac</i> (6')-Ic, <i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i>	<2	4	32

ID: identificação dos isolados; *Ano de coleta; CVC: cateter venoso central; LABA: lavado brônquico alveolar; STG: Sequenciamento total do genoma; IMI: Imipenem; Mer: meropenem; AMI: amicacina; ** (Sensititre®); ND: não determinado/sem sequenciamento.

3.2 Cultivo e armazenamento

As amostras foram armazenadas em BHI (Brain Heart Infusion) com 20% de glicerol a – 80°C. Todos os isolados foram cultivados em meio seletivo MacConkey, a 37°C por 18-24 horas no Laboratório de Investigação Médica – LIM54 da FMUSP.

3.3 Cepas controle

Foram utilizadas cepas controle para todos os ensaios de acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI (2018), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), conforme apresentado no quadro 2.

Quadro 2. Cepas controle ATCC utilizadas nos experimentos.

ATCC	Experimento:
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	CIM, Disco aproximação, CIM:CIM razão e Sensititre®
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CIM, Disco aproximação e CIM:CIM razão e Sensititre®

3.4 Antimicrobianos usados no estudo

As combinações de antimicrobianos foram escolhidas com base na literatura e nas opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções causadas por esses patógenos no HC-FMUSP.

Para a técnica de disco aproximação foram utilizados discos Oxoid (Basingstoke, UK) de 10µg de colistina, 30µg de amicacina, 10µg de gentamicina, 10µg de meropenem, 10µg de ertapenem, 200µg de fosfomicina, e 30/20µg ceftazidima-avibactam (Becton Dickinson, Sparks, MD). Foram utilizadas fitas de gradiente de antimicrobianos Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), MIC test strips (Liofilchem, Italy) e M.I.C.E. (Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK).

Os sais antimicrobianos de ceftazidima-avibactam (AztraZeneca, Verona, Italy), colistina, meropenem (USP-Reference Standard, Rockville, MD, USA), ampicacina, gentamicina, fosfomicina e ertapenem (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foram preparados considerando a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. Foram utilizados os solventes e diluentes adequados para cada antimicrobiano, seguindo os critérios estabelecidos pelo CLSI. A solução estoque foi preparada na concentração de 10.000 µg/mL. Para ceftazidima-avibactam foram realizadas diluições da droga na formulação comercial (2 g de ceftazidima e 0.5 g de avibactam por frasco). Esta concentração reflete a dose administrada no paciente (Marshall et al., 2017). Para o cálculo da quantidade necessária do antimicrobiano foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (µg/mL)}}{\text{Potência (µg/mg)}}$$

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas através do método de microdiluição em caldo para todos os isolados. O método foi realizado em duplicada, em dias alternados de acordo com o estabelecido pelo CLSI.

3.5.1 Preparo da microdiluição em placa

A solução inicial do antimicrobiano foi obtida a partir da solução estoque por diluições seriadas com o diluente adequado. Assim, 50 µl de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CMHCA) foi aplicado em todos os poços da placa de microtitulação com fundo arredondado, exceto na coluna 1. O volume de 100 µl do antimicrobiano, em uma concentração acima da desejada na placa, foi acrescentado em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal foram realizadas diluições seriadas, transferindo 50 µl do antimicrobiano da coluna 1 para as colunas seguintes até a coluna 10. Os 50 µl restantes foram dispensados na coluna 12, considerada o controle de esterilidade, onde não foi acrescentada a suspensão bacteriana para

verificar a ocorrência de contaminação durante o preparo e diluição do antimicrobiano.

3.5.2 Preparo da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana, na escala 0.5 de McFarland, foi preparada por espectrofotometria com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm ($\sim 1,8 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi diluída a 1:100 em CMHCA ($\sim 1,8 \times 10^6$ UFC/mL). O mesmo procedimento foi realizado para as cepas controle.

3.5.3 Inoculação da suspensão bacteriana

Foram acrescentados 50µl da suspensão bacteriana diluída em todas as colunas da placa, exceto na coluna 12, designada para o controle de esterilidade. A coluna 11 foi considerada como controle de crescimento. As placas foram fechadas, homogeneizadas e incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 20 horas.

3.5.4 Leitura das concentrações inibitórias mínimas

A leitura foi realizada em local iluminado utilizando-se um espelho para leitura de microplacas. As CIMs foram determinadas pela observação da turvação nos poços da microplaca. Os valores de CIM foram interpretados de acordo com EUCAST para colistina e CLSI para os outros antimicrobianos.

3.6 Sensititre®

A CIM de ceftazidima para 21 isolados (11 *A. baumannii*, 5 *P. aeruginosa* e 5 *S. marcescens*) foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo comercial Sensititre® GNX3F (Thermo Fisher). O teste foi realizado em duplicata de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.1 Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas

Foram transferidos 10 µl da suspensão bacteriana, na escala 0.5 de McFarland, para os tubos contendo 11 mL de CMHCA. Os tubos foram dispensados, em até 15 minutos, em canetas estéreis. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal foi transferido 50µl para cada poço da placa de microtitulação contendo os antimicrobianos secos. As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C por 18 a 20 horas.

3.6.2 Leitura das concentrações inibitórias mínimas

As CIMs foram determinadas pela visualização da turvação nos poços da microplaca. Foi utilizado o critério proposto pelo CLSI (2018) para interpretação da CIM de ceftazidima.

3.7 Time –kill (Curva de morte)

Os antimicrobianos foram testados nas concentrações de 1X CIM e 0,5X CIM (concentração subinibitória) (Sheng et al., 2011), determinadas anteriormente por microdiluição em caldo, exceto para fosfomicina que foram utilizadas as concentrações determinadas por ágar diluição.

3.7.1 Preparo do método de *time-kill*

A técnica foi baseada em trabalho publicado anteriormente (Petersen et al., 2006). Cinco frascos contendo CMHCA, o organismo teste e os antimicrobianos no volume final de 10 mL foram incubados a 37°C em shaker a 150 rpm. 100 µL da suspensão bacteriana, na escala 0,5 de McFarland (~ 1,8 X 10⁸ UFC/mL), foi acrescentada nos tubos, resultando em uma concentração final de aproximadamente 1,8 X 10⁶ UFC/mL. No frasco 1 foi acrescentado somente o antimicrobiano A, no frasco 2 o antimicrobiano B, ambos na concentração 1X CIM;

no frasco 3 os antimicrobianos combinados 1X CIM e no frasco 4 os antimicrobianos combinados na metade da CIM (0,5 X CIM). O frasco 5 foi designado como controle de crescimento, não sendo acrescentado o antimicrobiano. Os tubos com fosfomicina foram suplementados com 25 µg/mL de glicose-6-fosfato (G-6-P). Foram removidas alíquotas aos tempos 0 (após o preparo e sem incubação), 2, 4, 6 e 24 horas de cada um dos frascos. As alíquotas foram diluídas em 1:10, 1:100 e 1:1000 em salina a 0,9% e 10 µL foram dispensados em placas MHA e semeados em três direções diferentes para contagem das colônias viáveis. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20-24 horas.

3.7.2 Interpretação do *time-kill*

O resultado da contagem das colônias foi expresso em $\log_{10}$ das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (Sheng et al., 2011).

A sinergismo foi definido como a diminuição de $\geq 2\text{-}\log_{10}$ no número de colônias da combinação em comparação com os antimicrobianos sozinhos após 24 horas e em comparação com o tempo 0 (após a inoculação da suspensão bacteriana); indiferente quando ocorreu diminuição ou aumento de $<2\text{-}\log_{10}$ da combinação e antagonismo quando ocorreu aumento de $\geq 2\text{-}\log_{10}$ da combinação em comparação com os antimicrobianos sozinhos (Petersen et al., 2006; Sopirala et al., 2010).

3.8 Disco aproximação

As interações entre os antimicrobianos foram avaliadas qualitativamente por método de disco difusão, em duplicata. Os resultados discordantes em duplicata foram avaliados em triplicata.

3.8.1 Preparo do teste de disco aproximação

A suspensão bacteriana foi preparada em salina e ajustada na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,8 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria. Com um swab de algodão estéril, a suspensão foi inoculada em placa de MHA de 150 mm de diâmetro de forma homogênea. Após o preparo, a suspensão foi inoculada em até 15 minutos na placa.

Os discos foram aplicados na placa em até 15 minutos e separados por uma distância de 5 e/ou 20 milímetros, medidos com o auxílio de uma régua. As placas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 18 horas (Pillai et al., 2005).

3.8.2 Interpretação do teste de disco aproximação

A interpretação do teste foi realizada observando as zonas de inibição. Em interações sinérgicas é observada uma ponte próxima da junção das duas zonas de inibição ou a formação de uma zona fantasma; em combinações indiferentes são observados dois círculos independentes e em interações antagônicas é observada uma distorção próxima às duas zonas de inibição (Pillai et al., 2005).

3.9 CIM: CIM Razão

Para a realização do teste foi determinada, anteriormente, a CIM das cepas utilizando as fitas comerciais impregnadas com os antimicrobianos de acordo com o proposto por Pankey e Ashcraft (2005). A leitura e interpretação do teste foi realizada segundo as instruções dos fabricantes.

3.9.1 Determinação do tempo de difusão do antimicrobino no ágar

P. aeruginosa ATCC 27853 foi utilizada para validar o tempo de 1 hora para a difusão do antimicrobiano, a partir da fita no ágar de acordo com o protocolo descrito por Pankey e Ashcraft (2005). Uma placa de MHA foi semada com a suspensão utilizando os mesmos padrões do teste de disco-difusão. Duas fitas do mesmo

antimicrobianos foram colocadas lado a lado no ágar. Após uma hora em temperatura ambiente uma das fitas foi removida com o auxílio de uma pinça estéril (a outra fita permaneceu no ágar) e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 18 horas. As elipses e a CIM das fitas foram comparadas, sendo iguais foi considerado que o tempo de uma hora é adequado para difusão completa do antimicrobiano no ágar.

3.9.2 Preparo do teste CIM:CIM razão

A placa de MHA de 150 mm de diâmetro foi semeada com a suspensão, na escala 0,5 McFarland ($\sim 1,8 \times 10^8$ UFC/mL), com o auxílio de um swab de algodão estéril, seguindo os mesmos padrões do teste de disco difusão. As fitas dos antimicrobianos A e B foram aplicadas na placa em até 15 minutos, em regiões diferentes do ágar. Com a ajuda de uma alça bacteriológica foi marcado no ágar a CIM de cada antimicrobiano, determinada anteriormente. Após uma hora em temperatura ambiente as fitas foram removidas. No local da fita do antimicrobiano A foi aplicado uma nova fita do antimicrobiano B alinhando a CIM do antimicrobiano B com a marcação no ágar que corresponde a CIM do antimicrobiano A. O mesmo procedimento foi realizado para outro antimicrobiano. Os isolados em que a CIM ultrapassou o valor da concentração da fita, o valor maior da fita foi marcado no ágar (Pankey et al., 2013). As placas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas.

3.9.3 Interpretação do teste de CIM:CIM razão

A CIM dos antimicrobianos em combinação foi interpretada como o ponto de interseção da zona de inibição, em forma elíptica, com a fita. Foi calculado a Concentração Inibitória Fracionária (CIF) para determinação do sinergismo. Para os isolados com CIM maior que a concentração da fita foi considerado uma diluição acima, em dupla, para o cálculo do CIF (Pankey et al., 2013). Para determinação do CIF foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{CIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B = \frac{\text{CIM A+B}}{\text{CIM A}} + \frac{\text{CIM B+A}}{\text{CIM B}}$$

Sinergismo foi definido com $\sum \text{CIF} \leq 0,5$, indiferente $\sum \text{CIF} > 0,5 - 4$ e antagonismo $\sum \text{CIF} > 4$ (Pillai et al., 2005).

3.10 Análises dos resultados dos testes de sinergismo

Os resultados dos métodos de disco aproximação e CIM:CIM razão foram comparados com os resultados do *time-kill*, considerado como padrão ouro para os testes de sinergismo. A concentração de 1X CIM foi escolhida para comparação do método de *time-kill* com o método CIM:CIM razão (Pankey et al., 2013).

A concordância entre o *time-kill* e os outros métodos foi avaliada pelo teste estatístico de Kappa, utilizando o programa estatístico STATA (College Station, TX, USA) versão 13. A interpretação foi feita de acordo com o proposto por Fleiss (1981), sendo $k < 0,40$ considerado uma concordância pobre, $k = 0,40 - 0,75$ uma concordância boa e $k > 0,75$ concordância muito boa. Foi considerado significativo valor de $P < 0,05$. A concordância foi calculada por uma proporção entre as respostas concordantes nos métodos avaliados comparado com o método de *time-kill*.

3.10.1 Tipos de erros de interpretação

Os critérios de interpretação dos tipos de erros são apresentados no quadro 3, adaptado das recomendações da *Food and Drugs Administration* (FDA) (2009).

Quadro 3. Tipos de erros de interpretação encontrados nos testes de sinergismo.

Erros	<i>Time-kill</i>	Outros testes
Muito Grave	Antagônico	Não antagônico
Grave	Sinérgico	Antagônico
Menor	Indiferente	Sinérgico
	Sinérgico	Indiferente

4. RESULTADOS

4.1 Isolados bacterianos

Os isolados selecionados para o estudo foram obtidos de amostras clínicas coletadas de diferentes materiais biológicos de pacientes atendidos no HC-FMUSP. Os isolados foram caracterizados anteriormente e os resultados prévios são apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade, CIM₅₀ e CIM₉₀, apresentado na tabela 4 foram determinados e interpretados de acordo com EUCAST para fosfomicina e colistina e CLSI para os outros antimicrobianos.

A resistência a meropenem foi observada em 79% (11/14) dos isolados de *S. marcescens* e em todos os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Para os aminoglicosídeos foram observadas CIMs elevadas entre os isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (CIM₅₀ amicacina - 128 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente). Os isolados de *S. marcescens* apresentaram 64% (9/14) de resistência a amicacina.

Todos os isolados de *P. aeruginosa* foram sensíveis a colistina (CIM₅₀ 0,5 µg/mL e CIM₉₀ 1 µg/mL) e 7 isolados de *A. baumannii* apresentaram resistência a este antimicrobiano (CIM 8 µg/mL - 64 µg/mL). *S. marcescens* possui resistência intrínseca a colistina, porém um isolado apresentou CIM 1 µg/mL.

A CIM de ceftazidima (CAZ) e ceftazidima-avibactam (CZA) foi determinada para 21 isolados (11 *A. baumannii*, 5 *P. aeruginosa* e 5 *S. marcescens*). A resistência a CAZ para os isolados de *A. baumannii* foi observada em 73% (9/11), sendo que dois isolados apresentaram resistência intermediária (CIM 16 µg/mL). Para *P. aeruginosa* foi observado 80% (4/5) de resistência a CAZ, somente um isolado apresentou sensibilidade (CIM 4 µg/mL). Não foi observada redução da CIM de CAZ com a presença do inibidor para ambas as espécies.

A resistência a CAZ foi observada em um isolado *S. marcescens*, no entanto, todos os outros apresentaram resistência intermediária (CIM 8 µg/mL). Todos os isolados apresentaram sensibilidade a CZA (CIM <8/4 µg/mL).

Tabela 4. Determinação da CIM₅₀ e CIM₉₀ para 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores.

Agentes antimicrobianos	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Intervalo µg/mL	Resistência %
<i>A. baumannii</i>(n=20)				
Colistina	2	32	0,5-64	35
Meropenem	32	128	16-128	100
Amicacina	128	256	2-512	95
Gentamicina	16	64	2-128	55
Fosfomicina ^a	64	128	64 - 128	100
Ceftazidima ^{b,c}	>16	>16	16- >16	73
Ceftazidima-avibactam ^c	>16/4	>16/4	16/4->16/4	NA
<i>P.aeruginosa</i>(n=28)				
Colistina	0,5	1	0,5-1	0
Meropenem	256	512	16-512	100
Amicacina	512	512	2-512	64
Ceftazidima ^{b,d}	>16	>16	4- >16	80
Ceftazidima-avibactam ^d	>16/4	>16/4	<8/4 ->16/4	80
<i>S. marcescens</i>(n=14)				
Colistina	1024	1024	1-1024	93
Meropenem	4	64	0,125-64	79
Ertapenem	16	64	1-128	86
Amicacina	64	128	16-128	64
Ceftazidima ^{b,d}	8	8	8-16	20
Ceftazidima-avibactam ^d	<8/4	<8/4	<8/4-<8/4	0

a: Ágar diluição ; b: Sensititre®; c: 11 isolados; d:5 isolados,NA: Não aplicável

4.3 Resultados do método *time-kill*

O método de *time-kill* foi considerado padrão ouro para avaliação da interação entre os antimicrobianos. A figura 4 apresenta os resultados dos efeitos encontrados para as combinações avaliadas para cada espécie pelo método de *time-kill*. Não foi observado efeito antagônico para nenhuma combinação.

Para os isolados de *A.baumannii* foi encontrado maior efeito sinérgico para as combinações de colistina com meropenem 100% (20/20), colistina com amicacina

95% (19/20) e colistina com fosfomicina 100% (20/20). Entre os isolados de *P.aeruginosa* foi observado maior efeito sinérgico para as combinações de colistina com meropenem 43% (12/28) e meropenem com amicacina 36% (10/28). Para os isolados de *S. marcescens* foi observado maior efeito sinérgico para combinação de ceftazidima-avibactam com meropenem, 80% (4/5) dos isolados.

A figura 5 apresenta a curva de morte de 4 isolados com diferentes resultados encontrados da interação entre os antimicrobianos.

Figura 4. Resultados dos efeitos encontrados pelo método de *time-kill* para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores do estudo.

Figura 5. Dinâmica de crescimento em função do tempo de diferentes combinações de antimicrobianos. A- Ceftazidima-avibactam com meropenem (isolado 4-Sm), B - ceftazidima-avibactam com meropenem (isolado 13-Ab), C- Ertapenem com meropenem (isolado 5- Sm) D- colistina com meropenem (isolado 20- Ab).

O efeito sinérgico de ceftazidima-avibactam com meropenem foi avaliado para 21 isolados do estudo que foram selecionados por apresentarem diferentes oxacilinasases e o gene *bla_{kpc}*. A tabela 5 apresenta os genes de resistência e os resultados da interação entre ceftazidima-avibactam com meropenem para cada um dos 21 isolados. Foi observado efeito sinérgico somente para os isolados de *S. Marcescens*.

Tabela 5. Resultados da interação de ceftazidima-avibactam com meropenem para 21 isolados do estudo.

ID/Espécie	ST	Sensititre®	CIM (µg/mL)		Genes de resistência – PCR e STG	Disco aproximação		Time-kill
		CAZ	CZA	Mer		5 mm	20mm	
4/Ab	107	>16	32/8	128	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , aadB, strA, strB, fosA, floR, sul2,	I	ND	I
6/Ab	15	>16	512/128	128	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{IMP} , fosA, fosX,	I	ND	I
7/Ab	ND	>16	64/16	128	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{IMP}	I	ND	I
8/Ab	317	16	16/4	16	<i>bla</i> _{OXA-117} , aph(3')-Via, FosA, FosX,	I	ND	I
9/Ab	107	>16	32/8	32	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , aph(3')-Via, aadB, fosA, floR, sul2	I	ND	I
10/Ab	ND	16	16/4	64	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , <i>bla</i> _{IMP}	I	ND	I
12 /Ab	317	16	32/8	16	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , aph(3')-Via, fosA, fosX,	I	ND	I
13/Ab	107	>.16	32/8	128	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-143} , aph(3')-Vla, aadB, strA, strB, fosA, floR, sul2	I	ND	I
17/Ab	79	>16	64/16	32	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-65} , <i>bla</i> _{TEM-1} , aph(3')-Vla, aadA1, strA, strB, fosA, sul2, dfrA1	S	ND	I
19/Ab	317	>16	32/8	16	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , fosA,	I	ND	I
20/Ab	79	>16	64/16	16	<i>bla</i> _{OXA-117} , <i>bla</i> _{TEM-1} , aadA1, strA, strB, fosA, floR, sul2, dfrA1	S	ND	I
1/Pa	277	>16	512/128	256	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{OXA-56} , aph(3')-Iib, aadA7, rmtD, aacA4, fosA, aac(6')Ib-cr, cmx, catB7, sul1	I	ND	I
3/Pa	ND	>16	1024/256	512	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SPM}	I	ND	I
5/Pa	1853	4	4/1	16	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , aph(3')-Iib, fosA, catB7	NI	I	I
6/Pa	ND	>16	2048/512	512	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{SPM}	I	ND	I
14/Pa	277	>16	512/128	256	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{OXA-56} , aph(3')-Iib, aadA7, rmtD, aacA4, fosA, aac(6')Ib-cr, cmx, catB7, sul1	I	ND	I
1/Sm	ND	8	1/0,25	64	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , aph(3')-Vla, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, cat(pC194), sul2, dfrA8	NI	S	S
2/Sm	ND	8	1/0,25	32	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , aph(3')-Vla, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, sul2, dfrA8	NI	S	S
3/Sm	ND	16	4/1	4	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , aph(3')-Vla, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, cat(pC194), sul2	NI	S	S
4/Sm	ND	8	1/0,25	32	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , aph(3')-Vla, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, sul2, dfrA8	NI	S	S
6/Sm	ND	8	1/0,25	64	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , aph(3')-Vla, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, sul2, dfrA8	NI	S	I
Concordância (%)						86		
Kappa/valor deP						0,64/ P<0,001		

Ab: *A. baumannii*; Pa: *P. aeruginosa*; Sm: *S. marcescens*; NI: não foi possível interpretar; ND: não determinado; CAZ: ceftazidima; CZA: ceftazidima avibactam; Mer: meropenem; S: sinergismo, I: indiferente.

4.4 Resultados do método disco aproximação

Para a combinação de ceftazidima–avibactam com meropenem não foi possível avaliar efeito sinérgico para todos os isolados com a distância determinada inicialmente de 5 milímetros, sendo utilizada a distância de 20 milímetros para seis isolados sensíveis a ceftazidima–avibactam. Efeito sinérgico foi observado para todos os isolados de *S. marcescens* pelo método de disco aproximação, sendo o resultado confirmado pelo *time-kill* para 4/5 isolados avaliados (tabela 5).

A figura 6G mostra o resultado sinérgico observado para o isolado 1 de *S. marcescens* pelo método de disco aproximação, utilizando a distância de 20 milímetros. A concordância entre o disco aproximação e o *time-kill* para essa combinação quando avaliada para todos os isolados foi de 86% e o teste de kappa mostrou uma concordância boa ($K=0,64$; $P<0,001$).

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados encontrados da interação entre os antimicrobianos para as outras combinações pelos métodos de disco aproximação e *time-kill* para comparação. O número de efeitos sinérgicos identificados foi maior pelo método de *time-kill* do que o método de disco aproximação, exceto para os isolados de *S. marcescens*. Não foram observados efeitos antagônicos para as combinações avaliadas.

Para os isolados de *A.baumannii* foi encontrada maior concordância entre o método de disco aproximação e o *time-kill* para as combinações de fosfomicina com meropenem, 80% e fosfomicina com gentamicina, 75%. Ao analisar a concordância entre os métodos pelo teste de kappa foi encontrada uma concordância boa ($k=0,60$; $P=0,003$) para a combinação de fosfomicina com meropenem. As outras combinações apresentaram uma concordância pobre.

Foram analisados os resultados encontrados somente entre os isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, destacado na tabela 6. A concordância do disco aproximação com o *time-kill* foi de 86% para as combinações de colistina com meropenem, colistina com fosfomicina e fosfomicina com meropenem. O teste estatístico de kappa apresentou uma concordância boa para a combinação de fosfomicina com meropenem ($k=0,72$; $P=0,02$).

Tabela 6. Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e *time-kill* para os 13 isolados de *A. baumannii* sensíveis a colistina e os 7 isolados resistentes.

ID	Combinações de antimicrobianos									
	CL +Mer		CL + AMI		CL + FOS		FOS + Mer		FOS + GEN	
	DA	TK	DA	TK	DA	TK	DA	TK	DA	TK
1	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S
2	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
3	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S
4	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
5	I	S	I	S	I	S	I	S	S	S
6	I	S	I	S	I	S	S	S	I	S
7	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S
8	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S
9	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
10	I	S	I	S	I	S	S	I	S	S
11	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
12	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
13	I	S	I	S	I	S	I	I	S	S
14	S	S	I	S	S	S	I	I	S	I
15	S	S	I	S	S	S	I	I	S	I
16	S	S	I	S	S	S	I	I	S	I
17	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
18	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I
19	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S
20	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S
Sinergismo (%)	30	100	15	95	30	100	40	50	95	80
Concordância (%)	30		20		30		80		75	
Kappa/valor deP	0,0 / 0,500		0,0/ 0,333		0,0 / 0,500		0,60/0,003		-0,0/0,069	

ID:identificação dos isolados; CL:colistina; Mer:meropenem; AMI:amicacina; FOS:fosfomicina; GEN:gentamicina; S:sinergismo,I: indiferente; negrito: isolados resistentes a colistina.

A combinação de ertapenem com meropenem foi avaliada somente para os 7 isolados de *P. aeruginosa* produtores do gene *bla_{KPC}*. O efeito sinérgico pelo método de disco aproximação foi observado somente para um isolado (Figura 6E), que não apresentou efeito sinérgico na concentração subinibitória pelo *time-kill*.

A concordância do método com o *time-kill* para os isolados de *P.aeruginosa* foi de 57% para combinação de colistina com meropenem, 93% colistina com amicacina e 64% para meropenem com amicacina. A concordância foi considerada pobre pelo teste de kappa para as combinações avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e *time-kill* para os 28 isolados de *P. aeruginosa*.

ID	Combinações de antimicrobianos					
	CL +Mer		CL + AMI		Mer + AMI	
	DA	TK	DA	TK	DA	TK
1	I	S	I	I	I	I
2	I	I	I	I	I	I
3	I	S	I	I	I	S
4	I	I	I	I	I	S
5	I	I	I	I	I	S
6	I	I	I	I	I	S
7	I	I	I	I	I	S
8	I	S	I	I	I	S
9	I	S	I	I	I	S
10	I	I	I	I	I	I
11	I	I	I	I	I	I
12	I	I	I	I	I	I
13	I	I	I	I	I	I
14	I	I	I	I	I	I
15	I	S	I	I	I	I
16	I	I	I	I	I	I
17	I	I	I	I	I	I
18	I	I	I	I	I	I
19	I	S	I	I	I	I
20	I	I	I	I	I	I
21	I	S	I	I	I	I
22	I	I	I	I	I	I
23	I	I	I	I	I	I
24	I	S	I	S	I	S
25	I	S	I	S	I	S
26	I	S	I	I	I	I
27	I	S	I	I	I	I
28	I	S	I	I	I	S
Sinergismo (%)	0	43	0	7	0	36
Concordância (%)	57		93		64	
Kappa/valor deP	0,0/0		0,0/0		0,0/0	

ID:identificação dos isolados; CL:colistina; Mer:meropenem;AMI:amicacina; S: sinergismo,I: indiferente.

Os isolados de *S. marcescens* apresentaram maior efeito sinérgico pelo método de disco aproximação (Tabela 8). A concordância do método com o *time-kill* foi de 64% para combinação de colistina com meropenem, 93% colistina com amicacina e 86% ertapenem com meropenem. A concordância foi considerada pobre pelo teste de kappa para todas as combinações.

Tabela 8. Comparação dos resultados dos métodos de disco aproximação e *time-kill* para os 14 isolados de *S. marcescens*.

ID	Combinações de antimicrobianos					
	CL +Mer		CL + AMI		ETP + Mer	
	DA	TK	DA	TK	DA	TK
1	S	I	S	I	S	I
2	I	I	I	I	S	I
3	I	I	I	I	I	I
4	I	I	I	I	I	I
5	I	I	I	I	I	I
6	I	S	I	I	I	I
7	S	I	I	I	I	I
8	I	I	I	I	I	I
9	S	I	I	I	I	I
10	I	I	I	I	I	I
11	I	I	I	I	I	I
12	I	I	I	I	I	I
13	S	I	I	I	I	I
14	I	I	I	I	I	I
Sinergismo(%)	29	7	7	0	14	0
Concordância (%)	64		93		86	
Kappa/valor de P	-0,12/ 0,744		0,0/0		0,0/0,500	

ID:identificação dos isolados; CL:colistina; Mer:meropenem;AMI:amicacina; ETP:ertapenem; S:sinergismo,I:indiferente.

Os tipos de erros encontrados entre os métodos de disco aproximação e *time-kill* para as combinações testadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores são apresentados na tabela 9. Foram observados 14% de erros menores para combinação de ceftazidima-avibactam com meropenem, testada para os 21 isolados do estudo.

Tabela 9. Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores de acordo com os métodos de disco aproximação e *time-kill*.

Métodos	Disco aproximação e <i>Time-kill</i>		
Combinações	Tipos de erros		
	MG	G	M
<i>A. baumannii</i>			
Colistina + Meropenem	-	-	14 (70%)
Colistina + Amicacina	-	-	16 (80%)
Colistina + Fosfomicina	-	-	14 (70%)
Fosfomicina + Meropenem	-	-	4 (20%)
Fosfomicina + Gentamicina	-	-	5 (25%)
<i>P. aeruginosa</i>			
Colistina + Meropenem	-	-	12 (43%)
Colistina + Amicacina	-	-	2 (7%)
Meropenem + Amicacina	-	-	10 (36%)
<i>S. marcescens</i>			
Colistina + Meropenem	-	-	5 (36%)
Colistina + Amicacina	-	-	1 (7%)
Ertapenem + Meropenem	-	-	2(14%)

MG: muito grave; G: grave; M: menor

Figura 6. Resultados representativos dos efeitos encontrados no método de disco aproximação. A- colistina com meropenem (isolado 18-Ab), B- colistina com meropenem (isolado 13-Ab), C- colistina com fosfomicina (isolado 19- Ab), D-meropenem com amicacina (isolado 20- Pa), E- ertapenem com meropenem (isolado 5 Pa), F- ceftazidima-avibactam com meropenem (isolado 5 -Pa), G- ceftazidima-avibactam com meropenem (isolado 1- Sm), H- colistina com meropenem (isolado 1- Sm), I- colistina com amicacina (isolado 3- Sm).

4.5 Resultados do método CIM:CIM razão

Foram avaliados os efeitos das combinações de colistina com meropenem e colistina com amicacina para os isolados não fermentadores e a combinação de ertapenem com meropenem para os isolados fermentadores.

O efeito sinérgico em *A. baumannii* foi observado em 40% (8/20) dos isolados para combinação de colistina com meropenem e em 30% (6/20) para combinação de colistina com amicacina. A concordância entre o método epsilométrico com o *time-kill* para as combinações de colistina com meropenem e colistina com amicacina foi de 40% e 35%, respectivamente. A concordância foi considerada pobre pelo teste estatístico de kappa (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados dos métodos CIM:CIM razão e *time-kill* (1XCIM) para os 13 isolados de *A. baumannii* sensíveis a colistina e os 7 isolados resistentes.

ID	Combinações de antimicrobianos			
	CL +Mer		CL + AMI	
	CIM:CIM razão	<i>Time-kill</i> (1XCIM)	CIM:CIM razão	<i>Time-kill</i> (1XCIM)
1	0,08/S	S	0,14/S	S
2	1.3/I	S	1/I	S
3	0.07/S	S	1/I	S
4	1,25/I	S	1,75/I	S
5	1/I	S	1/I	S
6	1/I	S	2,12/I	S
7	1,25/I	S	2/I	S
8	0.75/I	S	2,25/I	S
9	1.5/I	S	2/I	S
10	0.6/I	S	1,1/I	S
11	1.55/I	S	2/I	S
12	0.75/I	S	2/I	S
13	1.12/I	S	1,12/I	S
14	0.3/S	S	0,24/S	S
15	0.08/S	S	0,12/S	S
16	0.18/S	S	0,25/S	S
17	0.12/S	S	0,4/S	S
18	0.3/S	S	0,18/S	S
19	0.75/I	S	1,37/I	I
20	0.18/S	S	0,75/I	S
Sinergismo(%)	40	100	30	95
Concordância (%)	40		35	
Kappa/valor deP	0,0/0		0,04/0,25	

ID:identificação dos isolados;CL:colistina; Mer:meropenem;AMI:amicacina;S:sinergismo,I: indifferente; negrito: isolados resistentes a colistina.

Ao analisar os resultados entre os isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, em destaque na tabela 10, a concordância com o *time-kill* foi de 86% para ambas as combinações. O teste de kappa apresentou uma concordância pobre para a combinação de colistina com meropenem ($K=0,0$; $P= 0,500$) e uma concordância boa para combinação de colistina com amicacina ($K = 0,58$; $P= 0,043$).

Não foram observados efeitos sinérgicos para os isolados de *P. aeruginosa* para as combinações avaliadas. A concordância entre o método epsilométrico com o *time-kill* foi de 57% para combinação de colistina com meropenem e 68% para combinação de colistina com amicacina (tabela 11). Os resultados de kappa não foram significantes.

Tabela 11. Resultados dos métodos CIM:CIM razão e *time-kill* (1XCIM) para os 28 isolados de *P. aeruginosa* para comparação.

ID	Combinações de antimicrobianos			
	CL +Mer		CL + AMI	
	CIM:CIM razão	<i>Time-kill</i> (1XCIM)	CIM:CIM razão	<i>Time-kill</i> (1XCIM)
1	0,56/I	S	1/I	I
2	1,37/I	I	1.5/I	I
3	1,5/I	S	2/I	S
4	3/I	I	1.5/I	S
5	3/I	I	1/I	S
6	3/I	I	0.95/I	S
7	3/I	I	2/I	S
8	3/I	S	2/I	I
9	2,5/I	S	1.2/I	S
10	1,37/I	I	1.1/I	I
11	1,37/I	I	0.85/I	I
12	1,37/I	I	1.1/I	I
13	1,37/I	I	0.85/I	I
14	1,37/I	I	1.25/I	I
15	1,07/I	S	1.25/I	I
16	1/I	I	0.75/I	I
17	1/I	I	1.5/I	I
18	1/I	I	1.5/I	I
19	2/I	S	1/I	I
20	2/I	I	2/I	I
21	2,5/I	S	2/I	I
22	2,5/I	I	2/I	I
23	2.5/I	I	2/I	I
24	2,5/I	S	1.2/I	S
25	1,1/I	S	1.75/I	S
26	1.12/I	S	1/I	I
27	1.12/I	S	0.75/I	I
28	3/I	S	2/I	S
Sinergismo(%)	0	43	0	32
Concordância(%)	57		68	
Kappa/valor de P	0,0/0		0,0/0	

ID:identificação dos isolados; CL:colistina; Mer:meropenem; AMI:amicacina; S: sinergismo; I: indiferente

A tabela 12 apresenta os resultados do método CIM:CIM razão e *time-kill* para os 14 isolados de *S. marcescens* para comparação. O efeito sinérgico foi observado em 36% (5/14) dos isolados de *S. marcescens* para combinação de ertapenem com meropenem pelo método epsilométrico, entretanto, pelo *time-kill* foi observado efeito sinérgico para um isolado. A concordância com o *time-kill* foi de 71% e o teste de kappa não foi significativo.

Tabela 12. Resultados dos métodos CIM:CIM razão e *time-kill* (1XCIM) para os 14 isolados de *S. marcescens* para comparação.

ID	Combinação de antimicrobiano	
	ETP + Mer	
	CIM:CIM razão	<i>Time-kill</i> (1XCIM)
1	0,4/S	S
2	0,4/S	I
3	0,4/S	I
4	0,8/I	I
5	0,5/S	I
6	0,85/I	I
7	1,42/I	I
8	1/I	I
9	1,5/I	I
10	1/I	I
11	2/I	I
12	0,76/I	I
13	0,52/S	I
14	0,68/I	I
Sinergismo(%)	36	7%
Concordância (%)	71	
Kappa/ valor de P	0,24/0,081	

ID: identificação dos isolados; ETP: ertapenem; Mer: meropenem; S: sinergismo; I: indiferente.

Os tipos de erros encontrados entre os métodos de CIM:CIM razão e *time-kill* para as combinações testadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores são apresentados na tabela 13. Foram avaliados os tipos de erros encontrados pelos métodos em comparação com o *time-kill* para os 7 isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, conforme apresentado na tabela 14.

Tabela 13. Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 48 isolados não fermentadores e 14 fermentadores de acordo com os métodos CIM:CIM razão e *time-kill*.

Métodos	CIM:CIM razão e <i>Time-kill</i>		
Combinações	Tipos de erros		
	MG	G	M
<i>A. baumannii</i>			
Colistina + Meropenem	-	-	12 (60%)
Colistina + Amicacina	-	-	13 (65%)
<i>P. aeruginosa</i>			
Colistina + Meropenem	-	-	12 (43%)
Colistina + Amicacina	-	-	9 (32%)
<i>S. marcescens</i>			
Meropenem + Ertapenem	-	-	4 (29%)

MG: muito grave; G: grave; M: menor

Tabela 14. Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas para os 7 isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina de acordo com os métodos disco aproximação, CIM: CIM razão com o *time-kill*.

Métodos	Disco aproximação e <i>Time-kill</i>			CIM:CIM razão e <i>Time-kill</i>		
Combinações	Tipos de erros					
	MG	G	M	MG	G	M
<i>A. baumannii</i>						
Colistina + Meropenem	-	-	1 (14%)	-	-	1 (14%)
Colistina + Amicacina	-	-	7 (86%)	-	-	1 (14%)
Colistina + Fosfomicina	-	-	1 (14%)	-	-	-
Fosfomicina+ Meropenem	-	-	1 (14%)	-	-	-
Fosfomicina + Gentamicina	-	-	4 (57%)	-	-	-

MG: muito grave; G: grave; M: menor

A figura 7 mostra os resultados observados no método CIM:CIM razão para dois isolados do estudo.

Figura 7. Resultados representativos dos efeitos encontrados no método CIM: CIM razão. A CIMs de colistina ($>256 \mu\text{g/mL}$) e meropenem ($32 \mu\text{g/mL}$) (isolado 14 - *A. baumannii*); B- CIMs colistina ($1 \mu\text{g/mL}$) e amicacina ($4 \mu\text{g/mL}$) (isolado 24 - *P. aeruginosa*); C- CIMs da combinação (colistina - $32 \mu\text{g/mL}$, meropenem - $8 \mu\text{g/mL}$) (isolado 14 - *A. baumannii*) - CIF 0,3 - sinergismo; D- CIMs da combinação (colistina - $0,75 \mu\text{g/mL}$, amicacina - $2 \mu\text{g/mL}$) (isolado 24 - *P. aeruginosa*) - CIF 1,2 - indiferente.

O presente trabalho avaliou métodos de sinergismo *in vitro* que podem ser realizados em laboratórios convencionais de microbiologia clínica utilizando como padrão-ouro o método de *time-kill*.

Dados sobre sinergismo na literatura são escassos. Alguns estudos compararam métodos *in vitro* de fácil execução, como disco difusão, para detecção de sinergismo, como alternativa aos métodos *time-kill* e *checkerboard* (Montanari et al., 2005; Tan et al., 2011; Soporila et al., 2010; Pankey et al., 2013). Os métodos que utilizam discos impregnados com antimicrobianos têm baixo custo e metodologia simples, no entanto, existem poucos estudos avaliando essa técnica para detecção de sinergismo *in vitro*. Os estudos publicados apresentam resultados controversos e a concordância entre os métodos é variável (Montanari et al., 2005; Stein et al., 2015; García-Salguero et al., 2015).

No nosso estudo, o método de disco aproximação (DA) detectou efeito sinérgico em isolados com resultado indiferente pelo *time-kill* (TK). Essa discordância foi maior entre os isolados de *S. marcescens* e para a combinação de fosfomicina com gentamicina para os isolados de *A. baumannii*. Estudo recente avaliou efeito sinérgico de colistina com meropenem e tigeciclina, contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, pelos métodos *checkerboard* e difusão em disco. Este estudo, também reportou efeito sinérgico pelo disco em isolados que não apresentaram efeito sinérgico pelo *checkerboard* (Stein et al., 2015).

García-Salguero e cols (2015) avaliaram efeito sinérgico de aminoglicosídeos com carbapenêmicos e outros antimicrobianos contra 10 isolados de *A. baumannii* MR, pelos métodos de difusão em disco, *checkerboard* e *time-kill*. Foram observados efeitos sinérgicos em ambos os métodos, no entanto, somente dois isolados foram submetidos ao ensaio de TK. A técnica de disco demonstrou sinergismo variável, no entanto, não foram apresentados no estudo os dados dos resultados encontrados pela técnica de disco para comparação com os demais métodos.

No presente estudo, a combinação de fosfomicina com meropenem para os isolados de *A. baumannii* apresentou concordância de 80% entre o TK e o DA. O nível de concordância pelo teste de kappa foi bom ($k = 0,60$; $P = 0,003$). As outras combinações avaliadas no estudo apresentaram uma concordância pobre entre o DA e o TK.

Singkham-in e Chatsuwan (2018) combinaram carbapenêmicos com amicacina, colistina ou fosfomicina contra 23 isolados clínicos de *A. baumannii*, pelo

método *checkerboard*. Os isolados eram resistentes a carbapenêmicos e a fosfomicina. O mecanismo de resistência a carbapenêmicos mais frequente foi à produção de OXA-23. O estudo apresentou divergência quando comparado com o presente trabalho. O efeito sinérgico foi observado em 65,2% dos isolados para a combinação de fosfomicina com imipenem, porém, não foram encontrados efeitos sinérgicos para combinação de fosfomicina com meropenem.

No entanto, outros estudos reportaram efeito sinérgico de fosfomicina com meropenem contra bactérias Gram-negativas. Samonis e cols (2012) investigaram a atividade sinérgica de fosfomicina em combinação com meropenem, contra isolados de *K. pneumoniae* multirresistente, *E. coli* e *P. aeruginosa*, pelo método epsilométrico Ângulo de 90°. O efeito sinérgico foi reportado em 70% dos 50 isolados de *K. pneumoniae* produtores de serino carbapenemases. Evren e cols (2013) avaliaram efeito sinérgico de fosfomicina com carbapenêmicos, colistina e tigeciclina contra 12 isolados de *K. pneumoniae* produtores de OXA-58, pelo método de *checkerboard*. Assim como no nosso estudo, todos os isolados eram resistentes a fosfomicina e carbapenêmicos. Atividade sinérgica foi reportada em 42% (5/12) dos isolados para combinação de fosfomicina com imipenem e 33% (4/12) para fosfomicina com meropenem. Embora por métodos diferentes, o nosso estudo observou efeito sinérgico para combinação de fosfomicina com meropenem em 40% (8/20) dos isolados de *A. baumannii* pelo método de DA e em 50% (10/20) pelo TK.

Foram identificados efeitos sinérgicos na combinação de fosfomicina com meropenem em 3/4 isolados de *A. baumannii* portadores do gene *bla*_{IMP}, pelo método de TK. O isolado que não apresentou efeito sinérgico também apresentava o gene *bla*_{OXA-143}. Não foram observados efeitos sinérgicos pelo TK para os isolados que carregavam o gene *bla*_{OXA-143}. Um estudo recente investigou efeito sinérgico de meropenem com vários antimicrobianos, contra isolados de Enterobacteriaceae produtores de diferentes carbapenemases. Um isolado produtor de metalo- β -lactamase (NDM-1) apresentou efeito sinérgico para fosfomicina com meropenem pelo método de *checkerboard* (Fredborg et al., 2017). Esse achado, em conjunto com o do presente estudo, sugere que a combinação pode ser ativa contra isolados produtores de metalo- β -lactamase.

A combinação de fosfomicina com carbapenêmicos apresentou resultados favoráveis *in vitro* contra isolados Gram-negativos multirresistentes (Samonis et al., 2012; Evren et al., 2013; Singkham-in; Chatsuwan, 2018). Uma possível explicação

para a atividade sinérgica da combinação e que as duas classes de antimicrobianos atuam na inibição da parede celular bacteriana, porém em diferentes sítios de ação. Portanto, a fosfomicina pode aumentar a inibição da síntese da parede celular, quando combinada com carbapenêmicos, como meropenem ou imipenem (Samonis et al., 2012; Singkham-in; Chatsuwan, 2018).

Estudos mostraram elevado efeito sinérgico em combinações com colistina entre isolados resistentes a esse antimicrobiano (Gaibani et al., 2014; Ni et al., 2015; Bae et al., 2016; Oliva et al., 2017); corroborando os achados da presente casuística.

S. marcescens apresenta resistência intrínseca a polimixinas, no entanto, o efeito sinérgico foi menor para as combinações com colistina, principalmente pelo TK, no presente estudo. Nastro e cols (2014) avaliaram efeito sinérgico de colistina com rifampicina, contra isolados de *A. baumannii* (portadores OXA-23), *K. pneumoniae* (portadores deKPC-2) e *S. marcescens* (portadores KPC-2 e VIM-16). Todos os isolados eram resistentes a colistina. O estudo também encontrou menor efeito sinérgico para os isolados de *S. marcescens*.

Um isolado de *S. marcescens*, no presente estudo, apresentou sensibilidade a colistina (CIM 1 µg/mL), entretanto, para esse isolado foram observados efeitos sinérgicos para as combinações com colistina pelo DA, porém não foram encontrados efeitos sinérgicos pelo TK. Lin e cols (2014) mostrou que alterações no LPS, mediadas pelo operon *arnBCADTEF*, podem ser responsáveis pela resistência intrínseca a polimixinas nessa espécie. A inativação dos genes *arnB*(UDP-Ara4O aminotransferase)e *arnC* (Ara4FN transferase) resultou em diminuição da CIM de polimixina B de 2048 µg/mL para 2 µg/mL na cepa mutante em comparação com o tipo selvagem. Investigações adicionais devem ser realizadas para compreender a sensibilidade a colistina neste isolado.

Uma meta-análise demonstrou que as combinações de polimixinas com carbapenêmicos ou rifampicina apresentaram mais de 50% de efeito sinérgico contra cepas *A. baumannii*, resistentes a colistina (Ni et al., 2015). Stein e cols (2015) avaliaram efeito sinérgico de colistina, meropenem e tigeciclina contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* multirresistentes. Efeito sinérgico foi observado, pelo *checkerboard*, somente para os isolados que apresentaram CIM elevada para todos os antimicrobianos.

No presente estudo encontramos maior concordância, entre os métodos de DA e TK, para as combinações com colistina entre os isolados de *A. baumannii*

resistentes a colistina, exceto para combinação de colistina com amicacina. O efeito sinérgico foi observado em ambos os métodos em 6/7 isolados para as combinações de colistina com meropenem e fosfomicina. A concordância foi alta também para a combinação de fosfomicina com meropenem entre esses isolados. Apenas a combinação de fosfomicina com meropenem apresentou concordância boa pelo teste estatístico de kappa ($k = 0,72; P = 0,02$).

A concordância entre o TK e o método CIM:CIM razão foi maior entre os isolados de *A. baumannii*, resistentes a colistina. Efeito sinérgico foi observado em ambos os métodos em 6/7 isolados na combinação de colistina com meropenem, porém o teste de kappa não foi significativo. A combinação de colistina com amicacina mostrou uma concordância boa ($K = 0,58; P = 0,043$).

Pankey e Ashcraft (2009) avaliaram efeito sinérgico de polimixina B com meropenem, contra 8 isolados de *A. baumannii* pelos métodos CIM:CIM razão e TK. Dois isolados eram positivos para o gene *bla_{OXA-23}*. Todos os isolados eram resistentes a meropenem e sensíveis a polimixina B. O efeito sinérgico foi reportado para todos os isolados pelo TK na concentração de 1X CIM, e em 63% dos isolados pelo método CIM:CIM razão. A concordância encontrada entre os métodos foi de 63%. No presente estudo, a concordância encontrada entre os isolados sensíveis e resistentes a colistina foi de 40% para a combinação de colistina com meropenem. O efeito sinérgico foi observado em 40% dos isolados pelo método epsilométrico e em 100% pelo TK 1X CIM.

No presente estudo, as combinações de colistina com meropenem e amicacina demonstraram elevado efeito sinérgico pelo TK para os isolados de *A. baumannii* (100% e 95%, respectivamente). No entanto, o método CIM:CIM razão identificou maior efeito sinérgico para os isolados resistentes a colistina do que os isolados sensíveis. Uma das hipóteses levantadas seria que essa diferença pode estar relacionada a limitações da metodologia, uma vez que, em cepas resistentes seria mais fácil de observar a redução da CIM da combinação, pelas fitas epsilométricas.

Os métodos de DA e CIM:CIM razão não identificaram efeito sinérgico entre os isolados de *P. aeruginosa* para as combinações com colistina e para a combinação de meropenem com amicacina. A concordância observada entre o TK e os métodos DA e CIM:CIM razão foi em relação às interações não sinérgicas.

Estudos anteriores, *in vitro*, observaram elevada taxa de sinergismo com a combinação de polimixinas com carbapenêmicos, principalmente entre isolados de *A. baumannii*, entretanto, para os isolados de *P.aeruginosa* o efeito sinérgico foi menor quando combinado com o carbapenêmico meropenem (Zusman et al.,2013). Similar ao encontrado no nosso estudo em que o número de efeitos sinérgicos para combinação de colistina com meropenem foi alto para os isolados de *A.baumannii*, (100% pelo *time-kill*), e menor para os isolados de *P.aeruginosa* (43% pelo *time-kill*).

Outro estudo avaliou efeito sinérgico de colistina com meropenem contra isolados multirresistentes de *A.baumannii* e de *P.aeruginosa* pelo método de *checkerboard*. O efeito sinérgico, $\Sigma\text{CIF} \leq 0.5$, ocorreu em 60% das cepas de *A.baumannii* e nenhum efeito sinérgico foi observado para os isolados *P.aeruginosa* (Timurkaynak et al.,2006).

Por outro lado, um estudo clínico mostrou resultado favorável para a combinação de polimixina B com um antimicrobiano sem atividade *in vitro*, principalmente um β -lactâmico ou carbapenêmico, com relação à monoterapia no tratamento de infecções causadas por isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* extensivamente resistentes (Rigatto et al., 2015).

Combinações com dois carbapenêmicos têm mostrado resultados promissores contra infecções causadas por bactérias KPC positivas (Bulik; Nicolau, 2011; Giamarellou et al.,2013). Um estudo investigou efeito sinérgico de meropenem com ertapenem, pelo método de *time-kill*, contra cepas de *K. pneumoniae* KPC positivas de três pacientes que responderam com sucesso ao tratamento com duplo carbapenêmico. O efeito sinérgico foi observado para os três isolados, com diminuição de 2-log_{10} no número de colônias após 24 horas, nos antimicrobianos combinados nas concentrações de 1X e 0,5X CIM (Oliva et al., 2014). A combinação de dois carbapenêmicos parece promissora, sendo necessários estudos avaliando números maiores de isolados, assim como, outras espécies de bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases.

Estudo recente avaliou a interação de meropenem com diferentes antimicrobianos, *in vitro*, contra 5 isolados (2 *E. coli* e 3 *K. pneumoniae*) com diferentes carbapenemases (KPC, NDM-1, VIM e OXA-181), pelo ensaio de *checkerboard* (Fredborg et al., 2017). A combinação de ertapenem com meropenem demonstrou efeito sinérgico para 4/5 isolados do estudo. Não foi observado efeito sinérgico para o isolado de *K. pneumoniae* KPC positivo.

No nosso estudo, a combinação de ertapenem com meropenem foi avaliada para todos os isolados de *S. marcescens* para os 7 isolados de *P. aeruginosa* KPC positivos. O efeito sinérgico, pelo TK, foi encontrado em 1/14 isolados de *S. marcescens*, nos antimicrobianos combinados 1X CIM. Esse isolado abrigava o gene *bla*_{KPC-2} e também apresentou efeito sinérgico pelos métodos DA e CIM: CIM razão. Não foram identificados efeitos sinérgicos na concentração subinibitória no presente estudo. Um isolado de *P. aeruginosa* apresentou efeito sinérgico para a combinação pelo método de DA, e mostrou efeito sinérgico pelo TK na concentração de 1X CIM.

Em contraste com nosso estudo, Oliva e cols (2017) encontraram efeito sinérgico pelo TK em 5/33 isolados *K. pneumoniae* produtor de carbapenemases, na concentração de 0,5X CIM de ertapenem com meropenem, e em 30/33 na concentração de 1X CIM. No entanto, outro estudo não encontrou efeito sinérgico de ertapenem com meropenem contra isolados de *K. pneumoniae* produtor de diferentes carbapenemases, como KPC-2 (Poirel et al., 2016). Essa divergência pode estar relacionada à expressão conjunta de outras beta-lactamases ou diferentes subgrupos de enzimas carbapenemases, como KPC-1 ou KPC-2 (Fredborg et al., 2017).

Poucos estudos foram publicados avaliando a interação de ceftazidima-avibactam (CZA) com outros antimicrobianos (Gaibani et al., 2017). O avibactam é um inibidor de β -lactamases que em conjunto com ceftazidima tem sido utilizado no tratamento de infecções contra bactéria Gram-negativas produtoras de carbapenemases (Zhanel et al., 2013). No presente estudo foi investigada a interação de meropenem com CZA para 21 isolados. Embora, um estudo recente tenha reportado a atividade da ceftazidima-avibactam contra *E. coli* portadora de OXA-23 (Sherry et al., 2018), não foram observados efeitos sinérgicos de CZA com meropenem para os isolados de *A. baumannii*, pelo método de TK, porém dois isolados que pertencem ao ST 79, portadores de OXA-23 e OXA-117 (variante OXA-51) apresentaram sinergia pelo DA. Contudo, estudo multicêntrico avaliou a atividade de CZA contra bactérias Gram-negativas, isoladas de pacientes hospitalizados, e não observou redução da CIM de ceftazidima contra *Acinetobacter* spp. (Flamm et al., 2016).

Os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram CIM elevada para CAZ (CIM₅₀ > 16 μ g/mL) e CZA (CIM₅₀ > 16/4 μ g/mL). Apenas um isolado foi sensível a ambos os

antimicrobianos, porém não apresentou efeito sinérgico com a combinação. Oavibactam não é ativo contra metalo- β -lactamases (Jonge et al.,2016), e 4/5isolados eram portadores dos genes *bla*_{KPC}e *bla*_{SPM}. Não foram observados efeitos sinérgicos pelos métodos TK e DA para esses isolados.

No presente estudo foi observada a redução da CIM de CAZ com a presença do avibactam para os isolados de *S. marcescens*. Outros estudos reportaram redução da CIM entre isolados de Enterobacteriaceaeportadoras do gene *bla*_{kpc-2}(Shields et al., 2015; Gaibania et al., 2017). Todos os isolados de *S. marcescens*foram sinérgicospelo método de DAe 4/5 isolados foram sinérgicospelo método de TK.A redução de 2 log₁₀ da combinação ocorreuapós duas horas do ensaio. No entanto, um isolado voltou a crescer após 24 horas na concentração sub-inibitória,nos antimicrobianos combinados. Este isolado não apresentou mutação no gene *bla*_{KPC-2}.

Estudo publicado recentemente investigou o efeito sinérgico, *in vitro*, de ceftazidima-avibactam com seis diferentes antimicrobianos pelo método de difusão em gradiente. Foram avaliados13 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 e KPC-3, sendo 11 isolados sensíveis e 2 resistentes a CZA. Os dois isolados resistentes apresentaram mutações no gene *bla*_{KPC-3}. O estudo observou elevado efeito sinérgico para a combinação de CZA com meropenem ou imipenem, incluindo os isolados resistentes a CZA (Gaibani et al., 2017). Não encontramos estudos de sinergismo de CZA contra *S. marcescens* publicados na literatura.

Outro estudo demonstrou efeito sinérgico *in vitro*, utilizando a técnica de difusão em disco, e a eficácia clínica da ceftazidima-avibactam com carbapenêmico no tratamento de um paciente com infecção causada por um isolado de *K. pneumoniae* produtor de KPC (Camargo et al.,2015). Semelhante ao nosso estudo, uma vez que observamos efeito sinérgico *in vitro*de ceftazidima-avibactam com meropenem pelo método de DA.

O método de DA apresentou uma boa correlação com o TK para a combinação de CZA com meropenem (K= 0,64;P <0,001). Para essa combinação foram utilizadas duas distâncias diferentes, entre os discos, para determinação do efeito sinérgico. Montanari e cols (2005), também utilizaram duas distâncias diferentes para avaliar a interação entre os antimicrobianos combinados, pela técnica de DA. Foram utilizadasas distâncias de 12 e 14 mm, estabelecida de acordo

com o ponto de corte dos antimicrobianos. Esse estudo evidenciou que a distância de 12 mm foi melhor para reconhecer sinergismo.

No presente estudo, a distância de cinco milímetros foi estabelecida para determinação da interação entre os antimicrobianos, de acordo com o perfil encontrado entre os nossos isolados. No entanto, para seis isolados, sensíveis a CZA, foi utilizado à distância de 20 mm para interpretação da interação entre os antimicrobianos. O uso de duas distâncias diferentes no método de DA pode ser útil para detectar com precisão a interação entre os antimicrobianos.

Os resultados discordantes entre os métodos testados e o TK foram classificados em tipos de erros de interpretação. Não foi observado efeito antagônico para nenhum método. Portanto, foram encontrados somente erros menores no estudo. Para os isolados de *A.baumannii*, menores porcentagens de erros (14%) foram observadas entre as combinações avaliadas para os isolados resistentes a colistina, pelos métodos de DA e CIM:CIM razão. A combinação de fosfomicina com meropenem apresentou baixa porcentagem de erros para o método de DA. Para as outras espécies, foi observada menor porcentagem de erros para a combinação de colistina com amicacina (7%) para *P. aeruginosa*, e ertapenem com meropenem (14%) para *S. marcescens*.

Os resultados dos testes avaliados apresentam valores de erros acima do aceitável pelo FDA e CLSI. Nos critérios para avaliação de testes, são aceitas taxas de até 10% para os erros menores. Entretanto, esses critérios não foram estabelecidos para os testes de sinergismo *in vitro*. Estudos mais detalhados são necessários para avaliar a aplicação desta técnica na avaliação dos métodos de sinergismo *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

- A concordância entre o *time-kill* e o método CIM:CIM razão foi variável, dependendo da combinação de antimicrobianos, do perfil de sensibilidade, e do mecanismo de resistência dos isolados.
- O método CIM:CIM razão apresentou maior concordância com o *time-kill* (86%) entre os isolados resistentes a colistina. Em geral, a combinação de colistina-amicacina apresentou boa concordância pelo teste estatístico de kappa.
- A utilização de duas distâncias (5 e 20 mm) entre os discos pode ser útil para determinar a interação entre os antimicrobianos pelo método de disco aproximação.
- O método de disco aproximação mostrou uma alta concordância com o *time-kill*, na combinação de fosfomicina com meropenem para *A. baumannii*. A concordância foi considerada boa pelo teste de kappa e a porcentagem de erros menores foi baixa. Uma boa correlação também foi observada para essa combinação entre os isolados resistentes a colistina e para as combinações colistina-meropenem e colistina-fosfomicina.
- A combinação de ceftazidima-avibactam com meropenem mostrou grande proporção de sinergismo para os isolados de *S. marcescens*. O método de disco aproximação apresentou uma boa correlação com o *time-kill* para essa combinação, podendo ser usado para avaliar sinergismo *in vitro*.
- Não foi observado efeito antagônico para nenhum método. Portanto, foram encontrados somente erros menores no estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Administration, U.F.A.D. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; guidance for industry and FDA. Food and Drug Administration. Rockville, MD:US Food and Drug Administration, 2009.

Ambler, RP. The Structure of Beta-Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.1980; 289 (1036): 321-331.

Anvisa- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16. 2016.

Bae S, Kim MC, Park SJ, Kim HS, Sung H, Kim MN, et al. *In vitro* synergistic activity of antimicrobial agents in combination against clinical isolates of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 6774–6779.

Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2000; 38:43–50.

Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of β -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(9):3299-3305.

Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:428–432.

Bulik CC, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:3002–4.

Bush K, Jacoby G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 969–76.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995; 39(6): 1211, 1995.

Camargo JF, Simkins J, Beduschi T, Tekin A, Aragon L, Pérez-Cardona A, et al. Successful treatment of carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:5903–8.

Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 1804–1814.

Cayô R, Leme RCP, Streling AP, Matos AP, Nodari CS, Chaves JRE, Brandão JLF, et al. *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2017; 87: 357–358.

Chagas TP, Carvalho KR, Santos ICO, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2014; 79: 468–472.

Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, et al. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *Journal of Medical Microbiology.* 2017; 66:1722–1729.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-eight Informational Supplement.* CLSI supplement M100 S28. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

Cprek JB, Gallagher JC. Ertapenem-containing double-carbapenem therapy for treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:669–673.

CVE – Centro de Controle de Vigilância Epidemiológica. 2016; <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/sistema-de-vigilancia-epidemiologica>. Acesso em: 04/05/18.

Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, 56:367–372.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing clinical breakpoints*, 2018. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.

Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27(2): 241–263.

Evren E, Azap OK, Çolakoğlu S, Arslan H. *In vitro* activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48–positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013; 76: 335–338.

Flamm RK, Nichols WW, Sader HS, Farrel DJ, Jones RN. *In vitro* activity of ceftazidime/avibactam against Gram-negative pathogens isolated from pneumonia in hospitalised patients, including ventilated patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 47(3):235–42.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley; 1981.

Fredborg M, Sondergaard TE, Wang M. Synergistic activities of meropenem double and triple combinations against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017; 88:355–360.

Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, Ambretti S. *In vitro* activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 1856–1865.

Gaibani P, Campoli C, Lewis RE, Volpe SL, Scaltriti E, Giannella M, et al. *In vitro* interaction of ceftazidime–avibactam in combination with different antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017; 65:1–3.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52: 699–702.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader, HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 73: 354–360.

García-Salguero C, Rodríguez-Aviall, Picazo JJ, Culebras E. Can plazomicin alone or in combination be a therapeutic option against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*? *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:5959 –5966.

Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaikos I. Effectiveness of a double carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2388–90.

Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12): 5035-8.

Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Sahm DF, Nichols WW. *In vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem non susceptible Enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:3163–3169.

Konemann EW, Allen SD, Janda MW, Schreckenberger PC, Winn WCJ. *Diagnóstico Microbiológico/Texto e Atlas Colorido*. 6. ed. 2008; 1: 78-264.

Kresken M, Körber-Irrgang B, Läufer J, Decker-Burgard S, Davies T. *In vitro* activities of ceftobiprole combined with amikacin or levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of a synergistic effect using time–kill methodology. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011; 38:70–75.

Leite GC, Perdigão-Neto LV, Gaudereto JJ, Carrilho CMDM, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Effect of Antibiotics Combination and Comparison of Methods for Detection of Synergism in Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *J Infect Dis Ther*. 2015; 3:207.

Leite GC. *Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas contra isolados de Acinetobacter baumannii multidrogas resistentes com avaliação dos mecanismos de resistência*. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Lenhard RJ, Nation RL, Tsuji BT. Synergistic combinations of polymyxins. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016; 48: 607–613.

Lin QY, Tsai YL, Liu MC, Lin WC, Hsueh PR, Liaw SJ. *Serratia marcescens* arn, a PhoP-Regulated Locus Necessary for Polymyxin B Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(9): 5181–5190.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*.2002; 34(5): 634-40.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 268–281.

Mahlen SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol*. 2011; Rev 24: 755–791.

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J. Clin. Microbiol*.2011; 49(5):1866–1871.

Marshall S, Hujer AM, Rojas LJ, Papp- Wallace KM, Humphries RM, Spellberg B, et al. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome β -lactam resistance conferred by metallo- β -lactamases in *Enterobacteriaceae*? *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:e02243-16.

Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi A, Osuna C, Pichel M, Cassini MH. Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after Colistin Administration in a Hospital Setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(7): 2295–2302.

Mitsuguia CS, Tognim MCB, Cardoso CL, Carrara-Marroni FL, Garcia LB. *In vitro* activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*.2011; 38: 447– 450.

Montanari MP, Piccolib I, Mingoiaa M, Marchettib F, Varaldoa PE. Synergistic potential of ceftazidime plus amikacin or levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* as determined using a checkerboard and a disk diffusion technique. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005; 53: 157–160.

Moradigaravand D, Boinett CJ, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*. 2016; 26: 1101–1109.

Mostachio AK, Levin, AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(5): 396-401.

Nastro M, Rodriguez CH, Monge R, Zintgraff J, Neira L, Rebollo M, Vay C, Famiglietti A. Activity of the colistin–rifampicin combination against colistin-resistant, carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*. 2014; 26(4): 211-216.

Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*. 2011; 47(4): 409-420.

Ni W, Shao X, Di X, Cui J, Wang R, Liu Y. *In vitro* synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015; 45: 8–18.

Oliva A, D'Abramo A, D'Agostino C, Iannetta M, Mascellino MT, Gallinelli C, Mastroianni CM, Vullo V. Synergistic activity and effectiveness of a double-carbapenem regimen in pan-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69:1718–20.

Oliva A, Scorzolini L, Cipolla A, Mascellino MT, Cancelli F, Castaldi D, D'Abramo A, et al. *In vitro* evaluation of different antimicrobial combinations against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the activity of the double-carbapenem regimen is related to meropenem MIC value. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72: 1981–1984.

Opazo CA, Domínguez MY, Bello HT, Amyes SGB, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6(4):311-6.

Pankey GA, Ashcraft DS. *In vitro* synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:2959–64.

Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest® and time-kill assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2009; 63:228–232.

Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2011; 70: 561–564.

Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2013; 77:220-226.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(3):538-82.

Perdigão-Neto LV, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CMDM, Costa SF, Levin AS. Susceptibility of Multiresistant Gram-Negative Bacteria to Fosfomycin and Performance of Different Susceptibility Testing Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014; 58(3): p. 1763–1767.

Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57: 573–576.

Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. In: *Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian V, Ed. 5th ed. 2005 Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.

Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12(9): 826–836.

Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. *In vitro* evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 156–161.

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(6):568-85.

Pournaras S, Vronti G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time–kill assay. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;37: 244–247.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(3):440-58.

Rahal JJ. Novel Antibiotic Combinations against Infections with Almost Completely Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43:S95–9.

Rigatto MH, Vieira FJ, Antchevis LC, Behle TF, Lopes NT, Zavascki AP. Polymyxin B in combination with antimicrobials lacking *in vitro* activity versus polymyxin B in

monotherapy in critically ill patients with *Acinetobacterbaumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:6575–6580.

Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN Jr, Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*. 2017; 21(1):98–101.

Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensive Care*. 2015; 5(21): 1-15.

Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31:695–701.

Sheng WH, Wanga JT, Lib SY, Linb YC, Chenga A, Chena YC, Changa SC. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 70:380–386.

Sherry NL, Baines SL, Howden BP. Ceftazidime/avibactam susceptibility by three different susceptibility testing methods in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria from Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52(1):82-85.

Shields RK, Clancy CJ, Hao B, Hao B, Chen L, Press EG, et al. Effects of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase subtypes, extended-spectrum β -lactamases, and porin mutations on the *in vitro* activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:5793–5797.

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 pneumonia* Isolates. *PLoS ONE*. 2015; 10(6): e0126479.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control*. 2007; 35 (2):165-193.

Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Sacchi FPC, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. *J Clin Microbiol*. 2015; 53:2324 –2328.

Singkham-in U, Chatsuwan T. *In vitro* activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin, or fosfomycin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018; 169–17.

Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary Study of Colistin versus Colistin plus Fosfomycin for Treatment of CarbapenemResistant *Acinetobacter baumannii*Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(9): 5598–5601.

Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, Pancholi P. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant a *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(11): 4678–4683.

Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*. 2008; 13(47):1-11.

Tan TY, Lim TP, Lee WHL, Sasikal S, Hsu LY, Kwa AL. *In vitro* antibiotic synergy inextensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill,checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 436–8.

Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 30: 78:3-13.

Temkin E, Torre-Cisneros J, Beovic B, Benito N, Giannella M, Gilarranz R, et al. Ceftazidime-avibactam as salvage therapy for infections caused by carbapenem-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e01964-16.

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. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2006; 27: 224–228.

Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

Urban C, Mariano N, Rahal JJ. *In Vitro* Double and Triple Bactericidal Activities of Doripenem, Polymyxin B, and Rifampin against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010; 54(6): p. 2732–2734.

Villegas, MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn J, et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007; 51(4): 1553–1555.

White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of Three Different *In Vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1996; 40(8):1914–1918.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *F.E.M.S. Microbiol Rev.* 2011; 35:736–755.

Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical Characterization of a β -lactamase That Hydrolyzes Penems and Carbapenems from Two *Serratia marcescens* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34:755–758.

Zavascki AP, Barth L, Gonçalves ANS, Moro ALD, Fernandes JF, Martins AF. The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58, 387–392.

Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Philippe RS, et al. Ceftazidime-Avibactam: a Novel Cephalosporin/ β -lactamase Inhibitor Combination. *Drugs*. 2013; 73:159–177.

Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paule M. Systematic Review and Meta-Analysis of *In Vitro* Synergy of Polymyxins and Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(10): 5104–5111.