UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – ANÁLISES CLÍNICAS

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para
o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii*
Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas
no Brasil**

Micheli Medeiros

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo, Dezembro de 2012

Micheli Medeiros

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para
o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii*
Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas
no Brasil**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo, Dezembro de 2012

“Não deixe que o medo o impeça de realizar os seus sonhos.”

(desconhecido)

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
e aos meus sobrinhos fica o exemplo
de que é possível realizar os desejos
mais improváveis.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu desenvolvesse esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilton Lincopan pela dedicação, amizade, paciência, pelo exemplo de profissionalismo e acima de tudo pela oportunidade de aprendizado.

Aos meus pais Hamilton e Judith, meus exemplos de vida, pelo incentivo, apoio incondicional e amor mesmo à distância.

Aos meus irmãos Rodrigo e Fabrício, cunhada Roberta juntamente com: Letícia, Arthur, Bernardo e Manuela (os gordinhos mais lindos do mundo) pelo carinho, apoio e momentos de descontração em família.

Aos colegas de laboratório: Andreza, Emanuele, Helena, Isabela, Jacinta, Juan, Ketrin, Leandro, Lívia, Luana, Lucianne, Priscila, Rodrigo C., Rodrigo M. e Silvane, pelo apoio e colaboração com este trabalho.

Ao Prof. Antônio Piantino pelos animais concedidos na experimentação *in vivo*.

A Patrícia pela amizade e apoio no desenvolvimento deste projeto e revisão deste trabalho.

A Priscillia pela amizade e apoio no desenvolvimento da parte *in vivo* deste trabalho.

A Luciana pela amizade e comidinhas gostosas em todos os momentos.

A Irene, Helena, Bruna e Carol pelo convívio saudável.

Ao Yurik pela amizade e edição das fotos deste trabalho.

A Dra. Valéria Cassetari pela disponibilização de antimicrobianos para este estudo

A Dra. Sílvia Costa, Dra. Anna Sara Levin e Dr. Jorge Sampaio de pelas sugestões propostas no exame de qualificação.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

As secretarias de Pós-graduação e do departamento de Análises Clínicas

Ao Instituto de Ciências Biomédicas pelas instalações.

A Capes e Fapesp pela bolsa concedida.

A todos o meu mais sincero: MUITO OBRIGADA!

MEDEIROS, M. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil.** São Paulo. 2012. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grave problema de saúde pública cujo prognóstico tem sido desfavorecido pela emergência e endemicidade de bactérias multirresistentes (MRs). Neste cenário, seguindo uma tendência mundial, no Brasil, infecções por cepas de *Acinetobacter baumannii* MRs produtoras de carbapenemases do tipo OXA são atualmente consideradas uma emergência clínica e epidemiológica. Na falta de alternativas terapêuticas efetivas para infecções relacionadas, este trabalho objetivou avaliar efeitos sinérgicos (utilizando *checkerboard* e *time-kill*) decorrentes da combinação de 10 antimicrobianos de diferentes classes, contra 8 cepas MRs de *A. baumannii*, clonalmente não relacionadas, produtoras de carbapenemases do tipo OXA-23, OXA-72, OXA-58 e OXA-143, representativas de diferentes centros hospitalares do Brasil. Como resultado, a combinação amicacina/tigeciclina apresentou atividade sinérgica ($S = \sum CIF \leq 0,5$) e parcialmente sinérgica ($PS = \sum CIF 0,5-0,75$) contra 4 (50%) cepas produtoras de OXA-143 ou OXA-72, e 2 cepas (25%) produtoras de OXA-23, respectivamente. Por outro lado, a combinação polimixina B/imipenem apresentou atividade S e PS contra 3 (37,5%) isolados OXA-143, OXA-23 ou OXA-72 positivos, e 1 (12,5%) isolado produtor de OXA-58, respectivamente. Já, a combinação amicacina/ampicilina-sulbactam foi S contra 2 (25%) *A. baumannii* OXA-143 ou OXA-23 positivos, sendo PS contra dois (25%) *A. baumannii* OXA-58 ou OXA-143/23 positivos. De interesse, foi o efeito S da combinação polimixina B/vancomicina, contra 2 cepas (25%) produtoras de OXA-72 ou OXA-23. Por outro lado, a combinação ampicilina-sulbactam/rifampicina apresentou atividade PS contra 6 (75%) cepas produtoras das variantes OXA-23, OXA-143, OXA-72 ou OXA-58. Da mesma forma, rifampicina combinada com polimixina B foi sinérgica para uma cepa OXA-23 (12,5%) e PS para 5/8 (62,5%) cepas produtoras de OXA-72, OXA-58, OXA-23/OXA143 ou OXA-143. O efeito sinérgico da combinação polimixina B/imipenem foi confirmado, *in vivo*, no modelo murino de infecção, tanto por avaliação histopatológica como por redução das UFC/g pulmão ou baço ($p \leq 0,05$). Finalmente, foi avaliada a atividade, *in vitro*, do lípide catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA), individualmente e em combinação com tigeciclina. DDA possui efeito bactericida, e potencializou sinergicamente a tigeciclina contra 2 (25%) cepas OXA-143 ou OXA-23 positivas. A atividade do DDA, assim como a atividade da sua combinação com tigeciclina foram efetivas já na segunda hora de interação, como avaliado pelas curvas de morte. Em resumo, o efeito sinérgico decorrente do uso combinado de amicacina, tigeciclina, polimixina B, imipenem, rifampicina ou ampicilina/sulbactam, pode constituir uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções produzidas por cepas de *A. baumannii* MRs produtoras de oxacilinases, sendo que nanofragmentos catiônicos de bicamada do lipídeo sintético de DDA tem potencial para consolidar um produto de aplicação clínica.

PALAVRAS CHAVES: infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS), *Acinetobacter baumannii*, multirresistência, carbapenêmicos, oxacilinases, sinergismo, nanofragmentos de dioctadecildimetilamônio (DDA).

MEDEIROS, M. ***In vitro* and *in vivo* Synergistic Effects of Antibacterial Agents for the Treatment of multidrug-resistant OXA-type Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* infections endemic in Brazil.** Dissertation (masters degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a serious public health issue, which have been related with an unfavorable prognosis due to the emergence and endemicity of multidrug-resistant (MDR) bacteria. In this scenario, following a worldwide trend, in Brazil, infections produced by MDR OXA-type carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* are currently considered a clinical and epidemiological urgency. In the absence of effective therapeutic alternatives for related infections, this study aimed to evaluate synergistic effects (by using time-kill and checkerboard assays) achieved by the combination of 10 different classes of antimicrobial against 8 strains of MDR, clonally unrelated, *A. baumannii* strains producing OXA-23, OXA-72, OXA-58 and OXA-143 carbapenemases, being representatives of different medical centers in Brazil. As a result, the combination of amikacin / tigecycline showed synergistic ($S = \Sigma FIC \leq 0.5$) and partially synergistic ($PS = 0.5$ to $0.75 \Sigma FIC$) activity against 4 (50%) OXA-72 or OXA-143 producing *A. baumannii* strains, and two strains (25%) producing OXA-23, respectively. Moreover, the combination of polymyxin B / imipenem showed *S* and *PS* activity against 3 (37.5%) OXA-143, OXA-23 and OXA-72 positive isolates, and 1 (12.5%) OXA-58 producer, respectively. On the other hand, the combination amikacin / ampicillin-sulbactam was *S* against 2 (25%) OXA-143 and OXA-23 positive strains, being *PS* against two (25%) OXA-58- and OXA-143/23-producing *A. baumannii*. Of interest was the synergistic effect achieved by polymyxin B plus vancomycin against two strains (25%) producing OXA-72 and OXA-23, respectively. Furthermore, the ampicillin-sulbactam / rifampicin combination displayed a *PS* activity against six (75%) strains producing OXA-23, OXA-143, OXA-72 or OXA-58-type enzymes. Likewise, rifampicin combined with polymyxin B was *S* against 1 (25%) OXA-23-positive *A. baumannii* being *PS* to 5/8 (62.5%) strains producing OXA-72, OXA-58, OXA-23/OXA143 or OXA-143. The synergistic effect of the combination polymyxin B / imipenem was confirmed, *in vivo*, in the murine model of infection, by using both histopathological studies and bacterial clearance from the lungs and spleen (CFU/g, $p \leq 0.05$). Finally, we evaluated the *in vitro* activity of the cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DDA), alone and in combination with tigecycline. DDA display a bactericidal effect, enhancing synergistically the activity of tigecycline against 2 (25%) OXA-143 and OXA-23 positive strains, respectively. DDA activity alone and in combination with tigecycline was effective on the second hour of interaction, as evaluated by time-kill assays. In summary, the synergistic effect resulting from the combined use of amikacin, tigecycline, polymyxin B, imipenem, rifampicin or ampicillin / sulbactam, could be an alternative therapy for the treatment of infections caused by MDR *A. baumannii* strains producing oxacilinases. On the other hand, cationic bilayer nanofragments of DDA has potential for consolidating a product for medical application.

KEYWORDS: Healthcare-associated infections (HAIs), *Acinetobacter baumannii*, multidrug-resistant, carbapenems, oxacilinases, synergism, dioctadecyldimethylammonium

LISTA DE ABREVIATURAS

AK	Amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATB	Antimicrobiano
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAZ	Ceftazidima
CIF	Concentração Inibitória Fracional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011</i>
CR	Carbapenem Resistente
E-test	<i>Epsilometer test</i>
GEN	Gentamicina
h	Horas
IPM	Imipenem
IRAS	Infecção relacionada à assistência à saúde
Log	Logarítmo
mg	Miligramas
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MHCA	<i>Mueller-Hinton</i> cátion ajustado

mL	Militros
MR	Multirresistentes
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
OXA	Oxacilinase
PB	Polimixina B
RIF	Rifampicina
rpm	Rotações por minute
SAM	Ampicilina-sulbactam
SCOPE	<i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
TGC	Tigeciclina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VAN	Vancomicina
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> carbapenem resistente e infecção relacionada à assistência à saúde: impacto clínico e epidemiológico	3
1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> e produção de carbapenemase do tipo Oxacilinase	3
1.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> e produção de carbapenemase do tipo OXA-23-like	4
1.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> e produção de carbapenemase do tipo OXA-58-like	6
1.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> e produção de carbapenemase do tipo OXA-72-like	7
1.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> e produção de carbapenemase do tipo OXA-143-like	8
1.3. Uso combinado de antimicrobianos e efeito sinérgico: uma alternativa de tratamento para infecções por <i>A. baumannii</i> MR	9
1.3.1 Sinergismo	9
1.3.2 Metodologias para avaliar efeito sinérgico	10
1.3.2.1 Método de disco difusão	12
1.3.2.2 Método de checkerboard	13
1.3.2.3 Método Time-kill	14
1.3.2.4 Método epsilométrico (E-test):	14
1.3.2.5 Método epsilométrico modificado	15
1.4 Avaliação de novos compostos contra <i>Acinetobacter baumannii</i> MR	16
1.4.1 Brometo de dioctadecildimetilamônio, bicelas, atividade antibacteriana e veículo de drogas	16

1.5 Opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por <i>Acinetobacter baumannii</i>	18
1.5.1 Ampicilina-sulbactam	18
1.5.2 Imipenem	19
1.5.3 Polimixina B	20
1.5.4 Vancomicina	20
1.5.5 Tigeciclina	21
1.5.6 Rifampicina	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Amostras bacterianas	25
3.2 Condições de cultura	26
3.3 Agentes Antimicrobianos	26
3.4. Determinação da sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão	27
3.5 Determinação da atividade inibitória (Concentração inibitória mínima)	27
3.6. Teste de sinergismo, usando antibióticos de uso clínico, por método de microdiluição em caldo: checkerboard	28
3.7. Determinação da atividade bactericida (Concentração mínima letal, CML) e incorporação de solução de resazurina	29

3.8. Estudo Time-kill	30
3.9 Teste confirmatório de sinergismo pelo método de disco-difusão modificado	30
3.10. Atividade <i>in vivo</i> do efeito sinérgico em modelo murino de infecção sistêmica	31
3.11. Atividade antibacteriana de nanofragmentos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) contra <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
4 – RESULTADOS	34
4.1 Atividade sinérgica determinada por checkerboard	34
4.2 Concentração Mínima Letal (CML)	45
4.3 Estudo do Time-kill	46
4.4 Teste confirmatório de sinergismo pelo método ágar diluição modificado	50
4.5 Atividade <i>in vivo</i> do efeito sinérgico em modelo murino de infecção sistêmica	53
4.6 Avaliação de novo composto antimicrobiano contra <i>Acinetobacter baumannii</i>	56
5- DISCUSSÃO	59
6 - CONCLUSÕES	66
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Panorama de disseminação de OXA nos estados brasileiros _____	5
Figura 2 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito resultante da combinação de dois antibióticos utilizando a técnica de difusão do disco _____	13
Figura 3 - Método de <i>checkerboard</i> em placa de microtitulação _____	14
Figura 4 - Método epsilométrico para avaliar o efeito combinado de antibacterianos ____	15
Figura 5 - Esquema mostrando a formação dos fragmentos de bicamada (bicelas) de DDA, e os complexos DDA-antimicrobiano _____	18
Figura 6 - Estruturas químicas dos principais compostos antimicrobiano _____	23
Figura 7 - Cálculo da CIF. $CIF = CIM \text{ A combinação} / CIM \text{ A não combinada}$ _____	45
Figura 8 - Gráficos de cinética de crescimento em função do tempo da combinação polimixina B x imipenem _____	47
Figura 9 - Gráficos de cinética de crescimento em função do tempo da combinação polimixina B x vancomicina _____	48
Figura 10 - Método de difusão do disco modificado e método epsilométrico modificado para avaliar efeito sinérgico. _____	52
Figura 11 - Número de UFC/gr de <i>A. baumannii</i> , recuperados dos órgãos avaliados ____	53
Figura 12 - Avaliação histopatológica de tecido pulmonar de camundongo separados em grupos _____	57
Figura 13 - Gráficos de cinética de crescimento em função do tempo da combinação DDA x TGC _____	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação do índice de resistência aos antimicrobianos relatados pelo SENTRY entre 1997-2010, MYSTIC 2003 e SCOPE 2007-2010 _____	3
Tabela 2 - Características epidemiológicas, microbiológicas e perfil de suscetibilidade dos isolados submetidos a avaliação _____	26
Tabela 3 - Soluções estoque utilizados no experimento _____	27
Tabela 4 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória fracional (CIF), somatória das CIF (Σ CIF) e picos plasmáticos dos antimicrobianos para dois isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> MR que apresentaram sinergismo _____	35
Tabela 5 - Somatório dos índices de Concentração Inibitória Fracional (Σ CIF) para combinações antibacterianas com potencial terapêutico organizado segundo o <i>score</i> sinérgico/parcialmente sinérgico definindo maior atividade _____	44
Tabela 6 - Cepas com mais de um curva de morte x tempo e respectivos Σ CIF _____	46
Tabela 7 - Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com PB x IMP _____	49
Tabela 8 - Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com PB x VAN _____	50
Tabela 9 - Efeito combinado de antibacterianos avaliado pelo método de disco-difusão modificado utilizando placas de ágar MH contendo polimixina B _____	52
Tabela 10 - Concentração bactericida mínima e efeito sinérgico de DDA e tigeciclina contra cepas de <i>A. baumannii</i> produtoras de oxacilinases _____	59
Tabela 11 - Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com DDA x TCG _____	61

1- INTRODUÇÃO

1.1 *Acinetobacter baumannii* carbapenem resistente e infecção relacionada à assistência à saúde: impacto clínico e epidemiológico

Acinetobacter baumannii é um bacilo gram-negativo não fermentador, atualmente reconhecido como um patógeno nosocomial oportunista, no qual, nas últimas duas décadas teve sua importância clínica ressaltada devido ao surgimento de graves infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e a emergência de abrangentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos (ATBs) por estes microrganismos (Bergogne-Bérézin, 1997; Perez *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008).

Os sítios de infecção mais comuns de *A. baumannii* são o trato respiratório inferior, o trato urinário, a corrente sanguínea, pele e tecidos moles (incidência de infecções em queimados, ou infecções de sítio cirúrgico). Principais fatores de risco incluem procedimentos invasivos, tais como o uso de ventilação mecânica, cateter venoso central ou cateter urinário, e uso prévio de ATBs de amplo espectro (Fournier *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2010a; Boyd *et al.*, 2011).

A ocorrência de surtos prolongados de IRAS é facilitada por dois motivos: i) a tolerância à dessecação, e ii) a resistência a múltiplas drogas; o que contribui para a propagação destes isolados entre pacientes dentro do ambiente hospitalar (Barnaud *et al.*, 2010). Além disso, a epidemiologia da infecção por *A. baumannii* é muitas vezes complexa, desde que a coexistência de infecções epidêmicas e endêmicas favorecem a pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial selecionando isolados cada vez menos sensíveis até tornarem-se resistentes (Bergogne-Bérézin, 1996; Fournier *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

Uma das características mais marcantes das espécies de *Acinetobacter* é a sua extraordinária capacidade de desenvolver mecanismos de resistência múltipla contra as principais classes de antibióticos. De fato, eles se tornaram resistentes aos beta-lactâmicos de amplo espectro — cefalosporinas de terceira geração, carboxipenicilinas, e cada vez mais a carbapenêmicos —, e aminoglicosídeos, pela produção de uma grande variedade de enzimas hidrolíticas (i.e., beta-lactamases) e transferases que inativam aminoglicosídeos, respectivamente. Adicionalmente, a maioria das cepas são resistentes às fluoroquinolonas (Fournier *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

O amplo uso de ATBs tem contribuído para a emergência de bactérias MRs as quais são associadas com infecções hospitalares, e altos índices de morbidade e mortalidade (Marra *et al.*, 2006; Moura & Gir, 2007). Este problema é agravado pelo fracasso no desenvolvimento de novos antibióticos (Tillotson, 2008).

Os múltiplos mecanismos de resistência nestas bactérias podem ter uma origem intrínseca e/ou adquirida, incluindo: i) perda da permeabilidade da membrana; ii) efluxo de ATB; iii) alteração do sítio de ligação; iv) alteração do receptor da membrana; v) superprodução de enzimas; e, vi) rotas metabólicas alternativas. Atualmente, o principal problema no tratamento de infecções causadas por bactérias MR (incluindo *A. baumannii*), no Brasil, é a expressão de β -lactamases que hidrolisam antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) e cefalosporinas de terceira (ceftazidima,) e quarta (cefepime) geração, considerados de última escolha terapêutica (Sader *et al.*, 2001; Moreira, 2004; Kiffer *et al.*, 2005a).

Carbapenêmicos são drogas de escolha para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MR. Com relação a isto, os programas de vigilância antimicrobiana, *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) e *Surveillance and Control of Pathogens of*

Epidemiological Importance (SCOPE) tem demonstrado que a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* vem aumentando de forma considerável na América Latina, principalmente em países como Brasil, Argentina e Chile, entre os anos de 1997 a 2010 (Tabela 1) (Sader *et al.*, 2001; Kiffer *et al.*, 2005a; Fedler *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007; Gales *et al.*, 2011; Marra *et al.*, 2011; Gales *et al.*, 2012;).

Tabela 1. Variação do índice de resistência aos antimicrobianos relatados pelo SENTRY entre 1997-2010, MYSTIC 2003 e SCOPE 2007-2010:

Antimicrobiano	Números de isolados (% resistência) / ano de estudo				
	SENTRY	SENTRY	SENTRY	MYSTIC	SCOPE
	1997-1999 ^a	2006-2009 ^b	2008-2010 ^c	2003 ^d	2007-2010 ^e
Imipenem	9,5%	NR	71,4%	2,9%	55,9%
Ceftazidima	62%	57,6%	81,7%	59,1%	70,0%
Gentamicina	48,2%	NR	53,3%	27,7%	51,8%
Ciprofloxacina	55,5%	66,9%	62,6%	65,7%	73,4%
Amicacina	57,7%	51,4%	87,2%	57,7%	NR

^a Sader *et al.*, 2001; ^b Gales *et al.*, 2011; ^c Gales *et al.*, 2012; ^d Kiffer *et al.*, 2005a; ^e Marra *et al.*, 2011; NR, não reportado.

1.2 *Acinetobacter baumannii* e produção de carbapenemase do tipo Oxacilinases: importância clínica e ambiental

Carbapenemases do tipo oxacilinase (OXA) pertencentes à classe D da classificação de Ambler tem sido mundialmente reportadas em espécies de *Acinetobacter*, especialmente no ambiente hospitalar. Especificamente no Brasil, cepas produtoras de

OXA tem sido associadas a surtos de IRAS (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Antonio *et al.*, 2008; Clemente *et al.*, 2011).

A classe D se distingue de outras classes de enzimas, por conter uma serina no sítio ativo. Inicialmente, as principais espécies pertencentes à família Pseudomonadaceae, particularmente a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, mostraram resistência para alguns tipos de beta-lactâmicos, não carbapenêmicos, mediada pela ação destas enzimas, entretanto, a primeira carbapenemase do tipo OXA foi caracterizada a partir de uma cepa clínica de *A. baumannii* MR isolada de um paciente em Edimburgo, Escócia, em 1985 (Scaife *et al.*, 1995; Queenan & Bush, 2007).

Em *A. baumannii* oxacilinases classe D são subdividida em 6 grupos: OXA-23-like (OXA-23, OXA-27 e OXA-49), OXA-24/40-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72, OXA-160), OXA-58-like (OXA-96, OXA-97), OXA-51-like (Figueiredo, *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011), OXA-182, que está restrito a Coréia do Sul (Kim *et al.*, 2010), e mais recentemente uma nova variante foi identificada no Brasil (OXA-143), a qual tem sido restrita ao país com rápida disseminação nos principais centros urbanos (Higgins *et al.* 2009; 2010; Antonio *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2011, Werneck *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012) (Figura 1).

Infelizmente, isolados de *A. baumannii* produtores de oxacilinase do tipo OXA-23, tem sido identificados em esgoto hospitalar em Porto Alegre (Ferreira *et al.*, 2011) e em rios urbanos do estado de São Paulo (Oliveira *et al.*, 2011) o que infere na possibilidade de disseminação de cepas hospitalares para o ambiente, constituindo um serio problema de saúde pública.

Figura 1. Panorama de disseminação de OXA nos estados brasileiros. (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Antonio *et al.*, 2008; Schimith Bier *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2009; 2012; Mostachio *et al.*, 2009; 2012; Carvalho *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2010; Antonio *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2011; Antonio *et al.* 2011; Werneck *et al.*, 2011 Gionco *et al.*, 2011; Morais *et al.* 2012)

1.2.1 *Acinetobacter baumannii* e produção de carbapenemase do tipo OXA-23:

A primeira descrição de *A. baumannii* produtor de OXA-23 foi relatada na Escócia em 1985 (Scaife *et al.*, 1995). Desde então esta enzima tem sido reportada em vários países na última década, como Tunísia (Mansour *et al.*, 2008), Emirados Árabes Unidos (Mugnier *et al.*, 2008), Bulgária (Stoeva *et al.*, 2008), Afeganistão e Iraque (Calhoun *et al.*, 2008), Tailândia (Niumsup *et al.*, 2009), Coreia do Sul (Jeon *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009), Itália (Ansaldi *et al.*, 2011), França (Garlantézec *et al.*, 2011), China (Fu *et al.*, 2010 e Jiang *et al.*, 2012), Portugal (Manageiro *et al.*, 2012), Polônia (Nowak *et al.*, 2012), Grécia (Liakopoulos *et al.*, 2012) e Brasil (Dalla-Costa *et al.*, 2003).

No Brasil, aparentemente, a emergência e disseminação da oxacilinase OXA-23 iniciou no ano de 2003 em Curitiba, no estado do Paraná. Após 2003, esta enzima foi reportada em outros estados. (Figura 1)

Inicialmente no Brasil, o alto índice de resistência ao imipenem em *A. baumannii* foi atribuído à produção de metalo-beta-lactamase do tipo IMP-1 (Gales *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006). Porém, seguindo uma tendência mundial, a produção de oxacilinasas OXA-23 começou a ser reportada em diversos centros médicos, contribuindo com a endemicidade de múltiplos clones (Schmith Bier *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012), associados a surtos de infecção hospitalar (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Antonio *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009; 2012; Mostachio *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009; Schmith Bier *et al.*, 2010).

A hidrólise dos carbapenêmicos pela enzima OXA-23 contribui fortemente para o surgimento de cepas resistentes (Koh *et al.*, 2007), cuja aquisição está associada a fatores de risco tais como: tratamento antibiótico prévio, admissão na UTI, imunossupressão, e graves doenças subjacentes (Boo *et al.*, 2006).

O tratamento da infecção causada por *A. baumannii* carbapenem resistente torna-se complicado pela falta de opção terapêutica. Uma característica adicional das cepas positivas para OXA-23 tem sido a expressão de resistência para outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Wang *et al.*, 2007).

O limitado número de agentes ATBs exibindo atividade contra *A. baumannii* produtor de OXA-23 se reduz ao uso de polimixina e ampicilina/sulbactam (Levin, 1999; Zhou *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008), porém, cepas resistentes para ambos os antibióticos já tem sido descritas (Reis *et al.*, 2003), inferindo na emergência de fenótipos MR e/ou com resistência extensiva (XDR) (Magiorakos *et al.*, 2011).

1.2.2 *Acinetobacter baumannii* e produção de carbapenemase do tipo OXA-58:

A produção de carbapenemase OXA-58 tem sido reportada com menos frequência que OXA-23 e OXA-24, sendo que o seu espectro hidrolítico é maior (Héritier *et al.*, 2005; 2005b; Coelho *et al.*, 2006).

O primeiro caso de *A. baumannii* produtor de OXA-58 foi reportado na França em 2003, onde disseminou rapidamente (Marqué *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2005; Héritier *et al.*, 2005b). Posteriormente, cepas OXA-58 positivas foram descritas na Austrália (Peleg *et al.*, 2006), Reino Unido (Coelho *et al.*, 2006), Argentina (Merkier *et al.*, 2008), Grécia (Pournaras *et al.*, 2006; Papa *et al.*, 2009; Liakopoulos *et al.*, 2012), China (Lu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), Itália (Bertini *et al.*, 2006; Ansaldi *et al.*, 2011; Carretto *et al.*, 2011), Turquia (Kulah *et al.*, 2010), Brasil (Antonio *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2011).

A enzima OXA-58 confere resistência aos carbapenêmicos, monobactâmicos, e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Isolados produtores de OXA-58 têm apresentado um perfil de MR para aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfas, assim como, uma resistência intermediária para tigeciclina; sendo sensíveis exclusivamente para rifampicina, tetraciclina, colistina, polimixina B, e em alguns casos para ampicilina/sulbactam (Héritier *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2005; Bertini *et al.*, 2006; Carretto *et al.*, 2011).

Recentemente, foram relatados aqui no Brasil os primeiros casos de infecção por *A. baumannii* produtor de OXA-58, os quais foram identificados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Medeiros *et al.*, 2010; Antonio *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2011) (Figura 1)

1.2.3 *Acinetobacter baumannii* e produção de carbapenemase do tipo OXA-72:

A enzima OXA-72 está agrupada dentro da família OXA-24/40-like juntamente com OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40. (Peleg *et al.*, 2006, Lu *et al.*, 2009)

O primeiro relato de OXA-72 ocorreu na Tailândia em 2004 (GenBank accession no. AY739646) sendo posteriormente identificado em Taiwan no ano de 2004 (Lu *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011), assim como em outros países asiáticos, como China (Wang *et al.*, 2007) e Coréia do Sul (Lee *et al.*, 2009). Na Europa, isolados produtores de OXA-72 têm sido identificados na França (Barnaud, *et al.*, 2010), Espanha (Candel *et al.*, 2010), Croácia (Franolić-Kukina *et al.*, 2011). No Brasil, este tipo isolado tem sido reportado recentemente, em casos esporádicos nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Antonio *et al.*, 2011; Werneck *et al.*, 2011) e mais recentemente em Recife (comunicação pessoal, Professora Marcia Maria Camargo de Moraes, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco) (Figura 1).

Esta carbapenemase confere resistência à carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, porém, isolados produtores de OXA-72 têm apresentado um perfil de MR para aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sendo na maioria dos casos, exclusivamente sensíveis à polimixina B e colistina (Lu *et al.*, 2009; Candel *et al.*, 2010; Werneck *et al.*, 2011).

1.2.4 Acinetobacter baumannii e produção de carbapenemase do tipo OXA-143: novo evento genético emergente no Brasil.

Recentemente uma nova oxacilinase (denominada OXA-143) foi reportada por Higgins e colaboradores em 2009. O gene *bla*_{OXA-143} foi identificado em um isolado clínico de *A. baumannii* MR recuperado no Brasil, coletado em um hospital não especificado durante um estudo multicêntrico (Higgins *et al.*, 2009). O gene *bla*_{OXA-143} é relacionado com outras enzimas oxacilinasas do grupo OXA-24/40-like e OXA-182, com mais de 80% de similaridade (Peleg *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010).

Este novo evento genético, até agora tem sido exclusivamente reportado para *A. baumannii* no Brasil. Na ausência de estudos que avaliem o impacto deste novo determinante genético de resistência, o nosso grupo tem realizado um estudo multicêntrico em hospitais públicos do estado de São Paulo e Minas Gerais, reportando uma alta prevalência de isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-143 em São Paulo e Minas Gerais, o que poderia refletir um novo fenômeno com características de endemidade (Medeiros *et al.*, 2010, 2011; Antonio *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012). Durante o ano de 2011 foi relatado um caso de *A. baumannii* produtor de OXA-143 no estado do Rio de Janeiro e uma nova variante alélica do gene *bla*_{OXA-143} foi reportado no estado do Paraná (Gionco *et al.*, 2011, Werneck *et al.*, 2011). No 51st ICAAC realizado em Chicago, USA, em Setembro de 2011, Cayô e colaboradores reportaram que a presença de *A. baumannii* produtor de OXA-143 no Brasil data desde 1995 (Cayô *et al.*, 2011). Recentemente, cepas de *A. baumannii* produtoras de OXA-143 tem sido isoladas em Juiz de Fora, MG (Oliveira *et al.*, 2011) (Figura 1).

1.3 Uso combinado de antimicrobianos e efeito sinérgico: uma alternativa de tratamento para infecções por *A. baumannii* MR.

1.3.1 Sinergismo:

Sinergismo é uma interação positiva, no qual o efeito combinado dos ATBs é significativamente maior que seus efeitos independentes quando utilizados de forma separada (Lorian, 2006).

Já o antagonismo é uma interação negativa, no qual o efeito combinado dos fármacos a ser examinado é significativamente menor que os seus efeitos independentes quando testados separadamente (Lorian, 2006).

Quando não há interação significativa entre os ATBs testados, esse resultado deve ser descrito indiferente (Lorian, 2006).

Para uma padronização da interpretação do efeito sinérgico da combinação de ATBs é feito um cálculo através do somatório dos índices de concentração inibitória fracional (Σ CIF).

$$\text{CIF(A)} = \text{CIM(A) na combinação} / \text{CIM(A) sozinho}$$

$$\text{CIF(B)} = \text{CIM(B) na combinação} / \text{CIM(B) sozinho}$$

$$\Sigma\text{CIF} = \text{CIF(A)} + \text{CIF(B)}$$

O Σ CIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico; Σ CIF menor ou igual a 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico; enquanto que um Σ CIF maior a 4,0 corresponde a antagonismo; e um Σ CIF entre 0,75 - 4,0, corresponde à indiferença (Hall *et al.*, 1983, Fernández Cuenca *et al.*, 2003).

1.3.2. Metodologias para avaliar efeito sinérgico:

A resistência intrínseca e adquirida do *A. baumannii* à grande parte das classes de ATBs conhecidos tem comprometido os atuais esquemas terapêuticos. Juntamente com esse problema, há o grande número de empresas farmacêuticas que abandonaram a descoberta e desenvolvimento de novos produtos ATBs (Peleg *et al.*, 2008).

O uso de ATBs combinado reduz significativamente a dose utilizada para tratamento bem como a redução da toxicidade de alguns ATBs relacionados à dose utilizada para tratamento, como por exemplo, a polimixina B e aminoglicosídeos (Lorian, 2006).

Devido às limitadas opções de tratamento para infecções causadas por microrganismos MR uma das estratégias para superar a falta de alternativas terapêuticas é a avaliação do uso combinado de ATBs (Entenza *et al.*, 2009).

Através do sinergismo é possível obter um potencial benéfico para a terapia de associação de ATBs para o tratamento de infecções por *A. baumannii*. No entanto, o efeito sinérgico pode ser dependente do mecanismo de resistência da bactéria em estudo. No caso do *A. baumannii*, o efeito sinérgico de uma combinação antibacteriana contra uma cepa de *A. baumannii* produtor de uma oxacilinase específica, não poderia ser extrapolado para outras cepas produtoras dos diversos tipos de oxacilinas. Assim, se faz necessário avaliar cada isolado MR, clonalmente não relacionado, contendo um mecanismo de resistência específico, para poder identificar uma combinação com resultado sinérgico abrangente (Bonapace *et al.*, 2000). No Brasil, estudos sobre efeitos sinérgicos têm sido esporádicos e restritos a cepas não produtoras de carbapenemases (Kiffer *et al.*, 2005b; Guelfi *et al.*, 2008).

Dentre os métodos descritos para avaliar *in vitro* a sinergia entre ATBs, os testes de *checkerboard* e *time-kill* tem sido amplamente utilizados e validados. O teste de *checkerboard* é um indicador de atividade inibitória, é um teste relativamente fácil executar (Kiratisin *et al.*, 2010). O teste de *time-kill* avalia a atividade bactericida, mas é mais demorado e trabalhoso, porém a partir dos resultados podem ser obtidos dados de potencia em função do tempo de interação da combinação antibacteriana (Bonapace *et al.*, 2000, Sopirala 2010).

Recentes pesquisas têm apontado a importância do uso de combinações de cefalosporinas, ou imipenem com aminoglicosídeos, rifampicina, polimixinas, combinada com inibidores de beta-lactamases. (Kiratisin *et al.*, 2010; Sopirala 2010). Surpreendentemente, a associação ampicilina/sulbactam tem mostrado atividade contra espécie de *Acinetobacter* MR (Bergogne, 1997; Levin *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008), porém, como citado anteriormente, estes estudos não têm considerado a atividade contra isolados de *A. baumannii* MR produtores de oxacilinas.

Na atual crise antibiótica, uma alternativa tem sido a otimização do uso de ATBs existentes, baseados em dados de PK/PD e valores da CIM. Para atingir este objetivo, é necessária uma compreensão completa dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, para um uso terapêutico racional baseado em estratégias terapêuticas para estirpes altamente resistentes (Peleg *et al.*, 2006).

Dentre as combinações reportadas na literatura, o uso de ampicilina/sulbactam associada às polimixinas tem sido apontado como promissor. Outras combinações efetivas têm sido baseadas no uso de quinolonas, beta-lactâmicos, e/ou amicacina (Bonapace *et al.*, 2000; Peleg *et al.*, 2006).

1.3.2.1. Método de disco difusão:

Este método permite a avaliação qualitativa da interação entre agentes ATBs que se difundem em placas de ágar inoculados com o microrganismo. Este método é de fácil execução, cuja técnica é semelhante ao teste de susceptibilidade de disco-difusão (DD) utilizando o mesmo padrão de inóculo, placas de Mueller-Hinton (MH) e discos de ATB produzidos comercialmente para difusão (CLSI, 2009).

Após seguir as normas de preparação do ágar MH e inóculo, segundo a técnica de DD (CLSI 2009), discos contendo o ATB A e B são dispostos sobre o ágar MH previamente inoculado com o microrganismo teste, a uma distância igual ou maior do que a soma dos diâmetros dos halos de inibição dos fármacos quando testados sozinhos. A interação entre os discos contendo ATB é analisada após 16 a 18 horas de incubação em estufa a 36°C.

Na figura 2 (A) podemos observar dois halos de inibição independentes mostrando que uma droga A não interfere na ação da droga B. Já o sinergismo ocorre quando há aumento da zona de inibição entre os dois discos ATBs testados (Figura 2B). Quando há efeito antagônico, se pode observar a distorção do halo na interface das duas zonas de

inibição (Figura 2C). A figura 2D representa uma outra forma de visualização do efeito sinérgico, na qual a droga A e B não produzem halo de inibição decorrente na resistência da bactéria testada. Nesta condição, se produz uma zona fantasma entre os discos antibióticos testados (Lorian, 2006).

Figura 2: Avaliação *in vitro* do efeito resultante da combinação de dois antibióticos utilizando a técnica de difusão do disco. A, efeito aditivo. B e D, efeito sinérgico. C efeito antagônico. Área sombreada = crescimento bacteriano; áreas claras = zonas de inibição do crescimento bacteriano (Lorian, 2006).

1.3.2.2. Método de *checkerboard*:

O método *checkerboard* é a técnica mais utilizada para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* (Rand *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1997; Lorian 2006; Petersen *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2006). Isso se deve principalmente ao fato de possuir uma fácil interpretação, cujo cálculo e resultados são simples, requerendo materiais disponíveis em qualquer laboratório de microbiologia (Lorian, 2006).

O termo *checkerboard* se refere ao padrão de diluição dos ATBs distribuídos na placa de microtitulação, como se fosse um tabuleiro de xadrez. Na vertical, cada poço contém uma diferente concentração diluída do antibiótico de forma decrescente (poços identificados da A – H) (Figura 3). Já na horizontal, um segundo ATB se adiciona a cada poço da microplaca, de esquerda para a direita de forma crescente (Lorian, 2006). Cada poço possui concentrações diferentes de cada um dos dois ATBs testados em um mesmo volume final (Dougherty *et al.*, 1977; Lorian 2006). A vantagem deste método é que é possível testar várias combinações de diferentes concentrações de dois ATBs para uma mesma amostra, além de utilizar pequenas quantidades (volume) de cada droga testada. Dentre as limitações do método, este método só determina a atividade inibitória e não a atividade bactericida da combinação (Lorian, 2006).

Figura 3. Método de *checkerboard* em placa de microtitulação. Na vertical concentração diluída de cima para baixo de um ATB teste, e na horizontal um segundo ATB teste diluído da direita para a esquerda.

1.3.2.3. Método *Time-kill*:

Este método é também utilizado para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* (Rand *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1997; Lorian 2006; Petersen *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2006), através da diluição do inóculo com a combinação antimicrobiana em caldo MH, e semear alíquotas em placa de MH em tempos determinados e acompanhar o crescimento das colônias.

As vantagens desta técnica é o fornecimento dados sobre a atividade bactericida da associação de ATBs, e também proporciona uma imagem dinâmica da ação antimicrobiana e o tempo de interação (com base na contagem de colônias), diferente do *checkerboard*, que fornece apenas dados da concentração inibitória mínima da associação de ATBs e a verificação do crescimento é examinada apenas uma vez, após 16 a 24h (Lorian 2006).

O *time-kill* é um método trabalhoso e demorado, mas, os resultados são úteis para orientar a terapia. É essencial que as concentrações dos antimicrobianos testados sejam escolhidas com cuidado para que representem as concentrações teciduais necesssárias para combater o microrganismo no sítio de infecção. (White *et al.*, 1996; Lorian 2006).

1.3.2.4. Método epsilométrico:

Este método foi proposto por White e colaboradores em 1996, e é considerado o mais novo método para avaliar combinação sinérgica de ATBs. De fácil execução, a técnica é semelhante ao teste de susceptibilidade de disco-difusão, utilizando o mesmo padrão de inóculo e placas de MH (CLSI 2009), mas o diferencial é a forma de apresentação do agente ATB. O método consiste em sobrepor, de forma entrecruzada, fitas plásticas (E-test) impregnadas com uma concentração gradiente de ATB, na superfície de uma placa de ágar MH, previamente inoculada com a bactéria testada, sendo incubada

durante 18h. O entrecruzamento das fitas se realiza especificamente considerando a CIM (Figura 4). A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) é feita na intersecção da zona inibição de cada fita, porém, o efeito sinérgico é interpretado pela observação da queda da CIM de ambos antibióticos na zona da intersecção de ambas fitas (White *et al.*,1996; Bonapace *et al.*,2000).

Figura 4: Método epsilométrico para avaliar o efeito combinado de antibacterianos (White *et al.*,1996; Bonapace *et al.*, 2000).

1.3.2.5: Método epsilométrico modificado:

Este método avalia o efeito sinérgico utilizando fitas tipo E-test de um antibiótico A posicionadas sobre uma placa de ágar MH contendo uma concentração sub-inibitória (CIM/2) de um antibacteriano B. O ágar diluição segue as padronizações estabelecidas pelo CLSI para o preparo do ágar MH (CLSI, 2009). O antibiótico “B” é diluído e incorporado ao ágar MH em concentrações sub-inibitórias a CIM do próprio antibiótico

testado, e posteriormente esta placa é inoculada sendo subseqüentemente posicionada uma fita tipo E-test, contendo o antibiótico “A” (Wareham *et al.*,2006).

A leitura do teste é realizada pela observação da queda da CIM do ATB “A”, contido na fita tipo E-test, na placas contendo o ATB “B”. É considerado efeito sinérgico a queda da CIM em pelo menos uma diluição no gradiente ATB.

1.4 Avaliação de novos compostos contra *Acinetobacter baumannii* MR:

1.4.1 Brometo de dioctadecildimetilamônio: bicelas, atividade antibacteriana e veículo de drogas.

O DDA é um lipídeo catiônico sintético que contém duas longas cadeias de hidrocarbonetos saturados (Figura 6F). Quando sonicado, utilizando sonda de titânio, o DDA forma bicelas (DDA), que são nanofragmentos de bicamada versáteis sendo amplamente estudados como sistemas adjuvantes (Lincopan *et al.*, 2009). Além disso, DDA exibe uma atividade antimicrobiana intrínseca, inerente de lípides catiônicos que formam parte do grupo de amônios quaternários (Carmona-Ribeiro, 2000).

A auto-associação de lipídeos catiônicos em dispersões aquosas pode resultar em bicamadas fechadas como vesículas ou lipossomos (Pacheco & Carmona-Ribeiro, 2003), com a vantagem adicional de permitir adsorção, por atração eletrostática, de uma ampla variedade de biomoléculas ou estruturas biológicas, em sua maioria, negativamente carregadas. A preparação da dispersão lipídica composta por fragmentos de bicamada (BF) produzidos por sonicação, são estáveis em solução aquosa de baixa força iônica (até 1 mM de NaCl) devido à repulsão eletrostática que impede a eventual coalescência que ocorreria por efeito hidrofóbico (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1986).

Bicelas de DDA tem sido utilizados para carregar antígenos e/ou ATBs (Lincopan *et al.*,2009). Na Figura 5, observa-se uma visão esquemática da interação entre ATBs

hidrofóbicos com bicelas de DDA.

Figura 5. Esquema mostrando a formação dos fragmentos de bicamada (bicelas) de DDA, e os complexos DDA-antimicrobiano. Dispersões de fragmentos de DDA em baixa força iônica (1 mM) podem ser obtidos por sonicação, de vesículas fechadas, como previamente descrito (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006). Drogas e/ou antígenos carregados negativamente podem interagir com a cabeça polar catiônica dos lipídeos podendo assim carregar estes compostos por atração eletrostática dos compostos. Por outro, bordas hidrofóbicas das bicelas de DDA podem facilitar a incorporação de drogas mediante governada pela hidrofobicidade de algumas estruturas antibióticas diretamente com a borda hidrofóbica. O modelo de bicela foi adaptado de Oliveira e colaboradores em 2011.

A avaliação *in vitro* de DDA tem demonstrado atividade contra bactéria MRs, incluindo *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Por outro lado, um estudo prévio tem revelado atividade sinérgica de DDA quando associada à tigeciclina (Aliaga *et al.*, 2012)

1.5 Opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*

1.5.1 Ampicilina-sulbactam:

Este composto é uma associação de um beta-lactâmico e um inibidor de beta-lactamase. Os inibidores de beta-lactamase são beta-lactâmicos com atividade antibacteriana limitada e agem inibindo a atividade da enzima beta-lactamase (Levin *et.al*, 2003). Geralmente estes inibidores são utilizados em associação com beta-lactâmicos promovendo a restauração da atividade deste. (Greenwood, 2003). O sulbactam está

associado à ampicilina em uma proporção fixa 1:2 aumentando o espectro de atividade da ampicilina (Figura 6A). Esta associação é utilizada para tratamento tanto de gram-positivos quanto gram-negativos (CLSI, 2012).

Atualmente alguns trabalhos apontam atividade sinérgica da associação da ampicilina-sulbactam com tigeciclina (Petersen *et.al*, 2005), amicacina (Marques *et.al*, 1997; Savov *et.al*, 2002), tobramicina (Tatman *et.al*, 2004) e imipenem (Sheng *et.al*, 2011; Peck *et.al*, 2012).

1.5.2 Imipenem

O imipenem é um ATB que pertence a classe dos beta-lactâmicos, mais precisamente a sub-classe dos carbapenêmicos (figura 6B). Esta droga age inibindo a síntese da parede celular através da ligação do beta-lactâmico com as PBPs (P*enicillin* B*inding* P*rotein*) que são proteínas de ligação à penicilina, que catalisam a síntese do peptideoglicano presente na parede celular bacteriana, mediante uma reação de transpeptidação e transglicolação (Sauvage *et al.*, 2008; Madigan *et al*, 2012).

Os carbapenêmicos por sua vez, são mais eficientes e estáveis à degradação por beta-lactamases de amplo espectro, exibindo elevada atividade antimicrobiana contra quase todas as bactérias gram-negativas, incluindo não fermentadores MRs (Greenwood, 2003).

Estudos de efeitos sinérgicos têm sido publicados utilizando o imipenem em combinação com lipopeptídeos, glicilciclinas, aminoglicosídeos, aztreonam, rifampicina, e até mesmo beta-lactâmicos como a ampicilina-sulbactam (Marques *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2006; Wareham *et al.*, 2006; Principe *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010; Sopirala *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2011; Kirastisin *et al.*, 2012; Peck *et.al*, 2012).

1.5.3 Polimixina B:

A polimixina B (PB) é um ATB pertencente à classe dos lipopeptídeos (Figura 6C), que atuam principalmente na parede da célula bacteriana gram-negativa, levando a uma rápida alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática e levando a morte celular (Gales *et al.*, 2001).

Este fármaco tem demonstrado uma atividade antimicrobiana “*in vitro*” significativa contra bacilos gram-negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. (Michalopoulos *et al.*, 2008; Gales *et al.*, 2006; 2011). Atualmente é uma importante opção de ATB contra microrganismos MRs. (Zavascki *et al.*, 2007; Gales *et al.*, 2006; 2011)

Em trabalhos publicados por Yoon e colaboradores (2004), Wareham & Bean (2006), Pankey & Ashcraft (2008), foi demonstrada por *checkerboard* e método epsilométrico, o efeito sinérgico da PB em ensaios sinérgicos de, no qual obtiveram sucesso.

1.5.4 Vancomicina

A vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos, cujo mecanismo de ação é a inibição da síntese do peptideoglicano da parede da célula bacteriana na fase tardia, impedindo a incorporação de peptideoglicanos para a parede celular em crescimento, através da ligação da porção terminal de D-Alanil-D-Alanina com a cadeia lateral de pentapeptídeos (Reynolds, 1989; Jones, 2006).

Esta droga é amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e para sérias infecções por microrganismos gram-positivos em pacientes que são hipersensíveis a penicilina (figura 6D) (Greenwood, 2003; Jones, 2006; Mohr *et al.*, 2007; Petrosillo *et al.*, 2010).

Em 2010b Gordon & Wareham testaram uma combinação de antimicrobianos que não é convencional para o tratamento de infecção por *Acinetobacter baumannii*, um glicopeptídeo, no caso a vancomicina, utilizada para tratamento de gram-positivo, e um lipopeptídeo, a colistina, utilizada para tratamento de infecções por gram-negativos. Logo esta combinação apresentou sinergismo quando testadas em cepas de *A. baumannii* MRs.

Estudos de avaliação do efeito sinérgico decorrente do uso combinado de antibacterianos tem sido esporádicos no Brasil (Kiffer *et al.*, 2005; Guelfi *et al.*, 2008). Esta pratica médica tem sido realizada sem uma base laboratorial. Assim, uma vez que o panorama atual da resistência bacteriana tem comprometido os principais esquemas terapêuticos, adquirindo um caráter endêmico, o presente trabalho visou avaliar diferentes combinações de compostos antibacterianos para poder estabelecer possíveis esquemas terapêuticos para o tratamento da infecção produzida por cepas de *A. baumannii* MRs, produtoras de oxacilinases prevalentes no Brasil.

1.5.5 Tigeciclina

A tigeciclina é uma droga antimicrobiana de amplo espectro, membro da classe das glicilciclinas, derivado semi-sintético da minociclina, representando o primeiro ATB disponível desta classe para uso clínico (Noskin, 2005; Pankey, 2005). A tigeciclina atua inibindo a síntese protéica bacteriana através da sua ligação à subunidade 30s do ribossomo (Entenza *et al.*, 2009).

Devido a sua natureza de amplo espectro tem uma boa atuação tanto para gram-positivos como para gram-negativos (*S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium spp.*) incluindo enterobactérias e *Bacteroides spp.*, (Pankey, 2005; Noskin, 2005). Alguns estudos tem avaliado o uso tigeciclina, *in vitro*,

contra *A. baumannii* MR revelando uma atividade bacteriostática (Pachón-Ibáñez *et al.*, 2004; Maragakis *et al.*, 2008).

Outros estudos tem descrito um efeito sinérgico decorrente da combinação de tigeciclina com outros ATBs como carbapenêmicos, aminoglicosídeos, minociclina, lipopeptídeos, quinolonas, e inibidores de beta-lactamases (Petersen *et al.*, 2006; Moland *et al.*, 2008; Principe *et al.*, 2009; Sopirala *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

1.5.6 Rifampicina

A rifampicina é um ATB pertencente à classe das ansamicinas introduzidas na clínica na década de 70. (Almeida *et al.*, 2011). O mecanismo de ação desta droga é a inibição da síntese de RNA através do ataque a subunidade β da RNA polimerase. Esta droga possui amplo espectro e é utilizado nos esquemas de tratamento para a tuberculose, causada pelo microrganismo *M.tuberculosis* (Rattan *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2011; Brock).

Mas alguns trabalhos publicados demonstram que a combinação da rifampicina com tigeciclina (Petersen *et al.*, 2006; Entenza *et al.*, 2009; Príncipe *et al.*, 2009), ou com PB (Wareham *et al.*, 2006) ou ainda colistina (Liang *et al.*, 2011) descrevem um efeito sinérgico, parcialmente sinérgico ou indiferente.

Figura 6. Estruturas químicas dos principais compostos antimicrobiano: A) ampicilina-sulbactam B) imipenem, C) polimixina B; D) vancomicina; E) tigeciclina; F) brometo de dioctadecildimetilamônio; G) rifampicina

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o efeito sinérgico de diferentes combinações de antimicrobianos contra cepas endêmicas de *A. baumannii* MR, não relacionados clonalmente, produtores de oxacilinases.

2.2 Objetivos específicos

As combinações de diferentes classes de antibióticos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, inibidores de beta-lactamase, polimixinas, glicilciclinas) foram avaliadas contra isolados clínicos MR de *A. baumannii* produtor de OXA-23, OXA-58, OXA-72 ou OXA-143 recuperados de diferentes hospitais brasileiros:

1. Avaliar “*in vitro*” pelo método de “*checkerboard*” a ação sinérgica entre a combinação de dois ou três ATBs para a obtenção do índice de concentração inibitória fracional (CIF) e a sua somatória (Σ CIF) como medida de efeito sinérgico.
2. Analisar comparativamente a atividade inibitória e a bactericida entre os ATBs combinados e isolados.
3. Determinar a potência, *in vitro*, de combinações antibacterianas mediante cinéticas de curvas de morte em função do tempo.
4. Investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* do composto, brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA), sua utilização sozinho e combinado com tigeciclina contra de cepas de *A. baumannii* MR produtoras de oxacillinase.

5. Avaliar *in vivo*, em modelo murino de infecção sistêmica produzida por *A. baumannii* produtor de oxacilinase, o efeito sinérgico de combinações com comprovada atividade antibacteriana *in vitro*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Isolados clínicos (n=8), clonalmente não relacionados, de *A. baumannii*, recuperados de diferentes hospitais brasileiros, com perfil de MR aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Antonio *et al.*, 2008; Mostachio *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2010).

Para a determinação fenotípica das cepas de *A. baumannii* foram realizados antibiogramas pelo método de disco-difusão (DD) e microdiluição, seguindo as normas padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2009. O ponto de corte utilizado para o antimicrobiano tigeciclina foi baseado no critério estabelecido para enterobactérias, pelo *Food Drug Administration* (FDA). Cada bactéria foi inoculada em um caldo de crescimento, e incubada a 35°C até alcançar a turbidez padrão de escala 0,5 de McFarland.

A identificação do gene que codifica a oxacilinase de cada amostra foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com posterior sequenciamento. Todas as amostras apresentaram OXA-51, cujo determinante genético é intrínseco para a espécie *Acinetobacter baumannii* (Peleg *et al.*, 2008).

Na tabela 2 são apresentadas as características epidemiológicas, microbiológicas, perfil de suscetibilidade e, identificação dos genes que codificam a produção de oxacilinase, correspondente nas amostras avaliadas.

Tabela 2. Características epidemiológicas, microbiológicas e perfil de suscetibilidade dos isolados submetidos a avaliação.

Cepa	Data	Hospital (Estado) ¹	Amostra	ERIC -PCR	Perfil de Susceptibilidade (disco-difusão) ²								bla _{OXA}
					SAM	IPM	CAZ	TIG	GEN	AK	PB	CIP	
01	08/04	I (SP)	Sangue	A	R	R	R	S	R	R	-	R	58
4347	11/07	VIII (SP)	Secreção ferida	B	S	R	R	S	R	R	-	R	72
804	09/08	II (SP)	Cateter	C	S	R	R	S	R	S	-	R	143
28	10/08	IV (SP)	Secreção traqueal	D	S	R	R	S	R	R	-	R	143
1031	09/08	II (SP)	Urina	E	R	R	R	S	R	R	-	R	143, 23
81	08/08	IV (SP)	Secreção de ferida	F	R	R	R	S	R	R	-	R	143, 23
LDC	06/99	XII (PR)	Osso	A ³	S	R	R	S	R	R	-	R	23
HC ⁴	06/09	IX (SP)	Sangue	ND	S	R	R	S	S	I	-	R	23

¹ SP, São Paulo; PR, Paraná. ² SAM ampicilina/sulbactam; IPM imipenem; CAZ ceftazidima; TIG tigeciclina; GEN gentamicina; AK amicacina; PB polimixina B; CIP ciprofloxacina, ³ primeira cepa isolada em Curitiba endêmica (Dalla-Costa *et al.*, 2003). ⁴ HC-USP cepa não tipada. ND, não definido.

3.2. Condições de cultura

As cepas utilizadas foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas por 24 h em estufa controlada a 37°C. As colônias foram repicadas para 2 ml de caldo BHI (infusão cérebro-coração) e incubadas a 37°C, por 24 h sob agitação constante em *shaker* rotativo a 150 rpm. O resultado dessa semeadura foi acrescido de 20% de glicerol e congelado para preservação.

3.3 Agentes antimicrobianos:

Os sais antimicrobianos foram preparados considerando a potência (em UI/mg ou mg/mL) e a data de validade.

Tabela 3. Soluções estoque utilizados no experimento

Antibiótico	Solução estoque (mg)
Imipenem (Merck Sharp & Dohme)	2,5
Gentamicina (Novarfarma)	40
Amicacina (Teuto)	25
Ciprofloxacina (Bayer)	2,5
Tigeciclina (Pfizer)	5
Polimixina B (Sigma / EuroFarma)	0,5
Rifampicina (Sigma)	1
Ceftazidima (Glaxo Smith Kline)	10
Ampicilina/Sulbactam (EuroFarma)	20
Vancomicina (Sigma)	100

3.4. Determinação da sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão:

Para a determinação fenotípica das cepas de *A. baumannii* foi realizado o método de disco-difusão, seguindo as normas padronizadas do CLSI 2009/2012. Cada bactéria foi inoculada em um caldo de crescimento, e incubada a 37°C até alcançar a turbidez padrão de escala 0,5 de McFarland e semeadas em placas de ágar MH (®Oxoid). Discos contendo Ciprofloxacina (5µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg), tigeciclina (10µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg), ampicilina/sulbactam (10µg) foram dispostas nas placas de ágar MH. Os pontos de corte utilizados para os ATBs para DD foram baseados nos critérios estabelecidos pelo CLSI 2009/2012 e o critério para o ATB tigeciclina foi o estabelecido para Enterobactérias pelo *Food Drug Administration* (FDA).

3.5. Determinação da atividade inibitória (Concentração inibitória mínima)

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi empregado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI 2009/2012. A colônia foi inoculada em um caldo MH e incubada a 37°C até alcançar a turbidez padrão

de 0,5 McFarland. As diluições dos antibióticos foram feitas em caldo Mueller-Hinton (MH), ou em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA) (®BD) quando para o ATB PB, nas concentrações no qual serão analisadas, em seguida foram pipetadas em cada poço da placa, de microtitulação com fundo arredondado, 100µL da mesma concentração dos antibióticos diluídos. Em seguida foram adicionados 5µL do inóculo, e a placa foi fechada e levada para estufa à 37°C por 24 horas. Os pontos de corte utilizados para os ATBs na CIM, foram baseados nos critérios estabelecidos pelo CLSI 2012 para *A. baumannii*, com exceção dos ATBs vancomicina e rifampicina que foi utilizado o mesmo critério mas para a bactéria *Staphylococcus aureus*, e o critério para o ATB tigeciclina foi o estabelecido para Enterobactérias pelo *Food Drug Administration* (FDA). Todos os ensaios foram feitos em duplicata, em diferentes períodos de tempo.

3.6. Teste de sinergismo, usando antibióticos de uso clínico, por método de microdiluição em caldo: checkerboard

Para realizar a combinação de vários antimicrobianos para as cepas MR foi utilizado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI, 2009/2012.

Cada bactéria foi inoculada em um caldo de crescimento, incubando-se o caldo a 37°C até alcançar a turbidez padrão de escala 0,5 McFarland. As diluições dos antibióticos foram feitas em caldo MH nas concentrações determinadas anteriormente, exceto quando a diluição é do ATB PB que foi utilizado o caldo MHCA (CLSI, 2009). Em seguida 50µL de cada uma destas suspensões previamente diluídas foram distribuídas ao longo de uma placa estéril de microtitulação com fundo em formato arredondado na seguinte ordem: na vertical concentração diluída de cima para baixo de um ATB teste, e na horizontal um segundo ATB teste diluído da direita para a esquerda. As placas de microtitulação com as

diferentes combinações das drogas, nas diferentes concentrações, foram incubadas por 24 horas. A leitura foi feita visualmente observando-se a turvação macroscópica visível.

A interpretação do efeito sinérgico da combinação de antimicrobianos foi calculada pela somatória dos índices de concentração inibitória fracional A e B (Σ CIF), onde CIF (A ou B) = CIM do antibiótico A (ou B) em combinação / CIM do antibiótico A (ou B) sozinho, sendo que um Σ CIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico, Σ CIF menor ou igual a 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico, enquanto que um Σ CIF maior a 4,0 corresponde a antagonismo, e um Σ CIF entre 0,75 - 4,0, corresponde à indiferença (Hall *et al.*, 1983, Fernández Cuenca *et al.*, 2003).

Os pontos de corte utilizados para os ATBs na CIF, foram baseados nos critérios estabelecidos pelo CLSI 2012 para *A. baumannii*, com exceção dos ATBs vancomicina e rifampicina que foi utilizado o mesmo critério mas para a bactéria *Staphylococcus aureus*, e o critério para o ATB tigeciclina foi o estabelecido pelo FDA para Enterobactérias.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata, em diferentes intervalos de tempo.

3.7. Determinação da atividade bactericida (Concentração mínima letal, CML) e incorporação de solução de resazurina

A atividade bactericida foi avaliada após a determinação da inibição do crescimento macroscopicamente visível, em cada poço da placa de microtitulação. Foram colocadas em cada poço 30 μ L de uma solução de 0,01% de reagente resazurina, com posterior incubação por 12 a 18 horas em estufa à 37°C com atmosfera normal. A leitura foi feita visualmente. A mudança de cor da resazurina de azul para rosa mostra a redução do indicador, demonstrando a viabilidade de células bacterianas. Para considerar um resultado positivo, a mudança de cor de em cada poço, comparado ao observado no poço controle de crescimento positivo, indicou viabilidade celular (Nateche *et al.*, 2006; Hornsey

et al., 2011). Para validar o ensaio, a determinação da atividade bactericida foi comparada através do crescimento bacteriano macroscopicamente visível em placa de ágar, após a interação com cada antibacteriano e/ou sua combinação. Todos os ensaios foram feitos em duplicata, em diferentes intervalos de tempo.

3.8. Estudo *time-kill*

O estudo de *time-kill* (curva de morte) foi realizado com os mesmos ATB utilizados na microdiluição em caldo. A técnica foi proposta por Hemmer e colaboradores em 1979, para confirmar combinações sinérgicas do método de *checkerboard*. Este teste foi realizado de acordo as normas padronizadas do CLSI, M26-A de 1999. Em tubos o inóculo das cepas MR na escala 0,5 McFarland em 10 ml de caldo MH juntamente com a combinação de antibióticos pré-determinado F a 37°C nos tempos 0, 1, 2, 4 e 8 horas. Em seguida faz-se uma diluição 1:10, 1:100 e 1:1000 em caldo MH, com a pipeta dispensa 0,1mL em cada placa e semeia com alça de Drigalski de vidro em ágar nutriente de cada diluição. Todos os ensaios foram feitos em duplicata ou triplicata, em diferentes intervalos de tempo.

3.9 Teste confirmatório de sinergismo pelo método de disco-difusão modificado:

O teste de sinergismo pelo método ágar diluição modificado, seguiu as padronizações estabelecidas pelo CLSI para o preparo do ágar na metodologia ágar diluição padrão (CLSI, 2006). O antimicrobiano PB (Eurofarma®) foi fixado nas concentrações 1µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25µg/mL (Wareham *et al.*, 2006). Estas diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque, e tubos contendo 19 mL de ágar Iso-sensitest foram previamente esterilizados, e mantidos a uma temperatura entre 45°C a 50°C. Em seguida, 1 mL da solução ATB com concentração 20 vezes superior para

cada diluição testada, foi adicionada nos 19 mL de ágar Iso-sensitest (Oxoid®). Após homogeneização, o conteúdo foi depositado em placas de Petri de 90mm de diâmetro.

Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA) (®BD) na escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) e por espectrofotometria. Logo após as amostras foram semeadas em placas de ágar Iso-sensitest previamente preparados com concentrações de PB. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 18 a 20 horas. Após determinar a concentração inibitória mínima da PB em ágar difusão o teste foi repetido com o valor da diluição de PB no qual havia crescimento.

Um disco de antimicrobiano de rifampicina (μg), imipenem (10 μg) e vancomicina (μg), e outra com fita de ®E-test de Imipenem ou Vancomicina foram colocadas sobre o ágar semeado com amostra. (Wareham *et al.*, 2006).

A leitura do teste é feita por comparação entre as placas com diluições diferentes de PB e placa com ausência de PB. Será considerado efeito sinérgico as amostras que obtiverem aumento do halo de inibição ou diminuição no número de colônias com o aumento da concentração de PB no ágar Iso-sensitest.

Para todos os ensaios realizados, como controles foram utilizadas as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923.

3.10. Atividade *in vivo* do efeito sinérgico em modelo murino de infecção sistêmica

A atividade *in vivo* do efeito sinérgico de combinações com comprovada atividade antibacteriana *in vitro* foram avaliadas em um modelo murino de infecção sistêmica, induzida pelos agentes bacterianos estudados. Esta avaliação foi realizada utilizando camundongos *Swiss* fêmeas *outbred* com sete semanas de idade, isentos de agentes patogênicos, seguindo métodos aprovados pelo comitê de ética da FCF-USP.

A partir dos resultados sinérgicos, *in vitro*, foram padronizados esquemas terapêuticos para os testes *in vivo* (Gilbert *et al.*, 2010).

Foram formados 4 grupos de 13 camundongos cada, no qual se dividiram em grupo controle positivo (apenas inóculo, sem tratamento), grupo imipenem (tratado com IPM), grupo polimixina B (tratado com PB), grupo da combinação de imipenem com polimixina B (tratado com a combinação de IPM + PB) e um grupo controle negativo (sem inóculo e tratamento) com 8 camundongos.

Para cada modelo de infecção foram inoculados intraperitonealmente 0,5 mL de uma suspensão bacteriana MR (*A. baumannii* produtor de OXA-143) contendo $1,8 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

A proporção dos ATBs indicadas pelo método de *checkerboard* foi 0,5 µg/mL de PB e 16 µg/mL de IPM (1:32). A partir deste a dosagem dos antimicrobianos utilizados tanto no ensaio com apenas uma droga quanto no ensaio sinérgico foram calculados 2400 µg/kg imipenem e 75 µg/kg de PB divididas em 2 doses a cada 12 horas. A preparação dos antimicrobianos foram feitas uma hora antes da aplicação, em solução salina a 0,9% e inoculados intraperitonealmente 24 horas após a administração do inóculo, no esquema a cada 12 horas durante 3 dias.

Dois animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 0, 1 e 5 dias após a inoculação da bactéria em estudo. Os órgãos pulmão e baço foram retirados e divididos ao meio, metade do órgão foi armazenado em formaldeído 10% para histologia e a outra metade foi homogeneizado em almofariz com pistilo e diluído em PBS 1:10, 1:100 e 1:1000 e logo em seguida semeados em ágar MacConkey para contagem de UFC/g de órgão (pulmão, baço).

A análise histopatológica foi realizada em laboratório especializado e a fotodocumentação foi registrada através de microscopia utilizando Nikon Eclipse e800 microscope®.

3.11. Atividade antibacteriana de nanofragmentos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) contra *Acinetobacter baumannii*:

Nanofragmentos de bicamada (bicelas) de DDA foram produzidos por sonicação com sonda de titânio de 2mM ou 0,5 mg/mL de DDA em IGP (1 mM de fosfato de potássio, 287 mM de glicose, pH 7,0) como previamente descrito (Lincopan *et al.*, 2003). A dispersão foi centrifugada a 12.000 rpm por 1 hora a 4°C, para tirar resíduos de titânio, sendo esterilizada por filtração (0,45 µm) e conservado a 4°C em geladeira.

A estabilidade coloidal de DDA associado aos ATBs foi monitorada macroscopicamente pela observação de agregação (floculação). A combinação de DDA/tigeciclina foi baseada em estudos físico-químicos e de atividade bactericida, previamente estabelecidos (Aliaga *et al.*, 2012).

O complexo DDA/tigeciclina foi feito a partir da adição da tigeciclina diretamente nas dispersões DDA e logo depois diluído em uma gama de concentrações diferentes. A atividade *in vitro* de DDA e DDA/tigeciclina foi determinada por microdiluição, concentração mínima letal e curvas de morte.

3.12 Análise Estatística:

Todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (considerando a média de 3 ensaios). As diferenças estatísticas entre os grupos submetidos a infecção e tratamento foram analisadas por teste não paramétrico de comparações múltiplas, ANOVA. Foi considerado significativo um $p \leq 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 Atividade sinérgica determinada por checkerboard

Na tabela 4 são apresentados os resultados da determinação do efeito sinérgico de 14 combinações de antibióticos, para 8 cepas clonalmente não relacionadas de *Acinetobacter baumannii* MRs produtoras da carbapenemase OXA-143, OXA-23, (endêmicos nos Brasil), OXA 143/23, OXA-58 e OXA-72.

As combinações avaliadas foram:

- Imipenem x Gentamicina
- Amicacina x Tigeciclina
- Amicacina x Ampicilina/Sulbactam
- Amicacina x Imipenem
- Ceftazidima x Tigeciclina
- Polimixina B x Imipenem
- Gentamicina x Ciprofloxacina
- Amicacina x Ciprofloxacina
- Polimixina B x Vancomicina
- Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina
- Tigeciclina x Rifampicina
- Amicacina x Rifampicina
- Polimixina B x Rifampicina
- Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B

Tabela 4: Valores da concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória fracional (CIF), somatória das CIF (Σ CIF) e picos plasmáticos dos antimicrobianos para dois isolados de *Acinetobacter baumannii* MR que apresentaram sinergismo:

Cepa 804 OXA-143								
Combinação A x B	CIM A(μ g/mL)	CIM B(μ g/mL)	CIF A	CIF B	Σ CIF = CIF A + CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático (μ g/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	128	64,0	0,50	0,004	0,50	S	64,0/ 0,03	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	128	0,03	0,03	0,33	0,36	S	4,00/0,01	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	32,0	8,00	0,25	0,25	0,50	S	8,00/2,00	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	128	64,0	0,50	0,01	0,51	S	64,0/ 0,12	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	256	0,03	0,12	0,33	0,45	S	32,0/ 0,01	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	256	0,50	0,06	0,56	PS	0,50/16,0	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	1,00	16,0	0,50	0,007	0,50	S	0,50/0,12	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	16,0	16,0	0,12	0,007	0,13	S	2,00/0,12	4,6 / 15-30
Polimixina B x Vancomicina	0,50	256	0,50	0,25	0,75	PS	0,25/64,0	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	128	16,0	0,50	0,25	0,75	PS	64,0/2,00	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,25	8,00	1,00	0,25	1,25	I	0,25/2,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	4,00	0,25	0,50	0,75	PS	8,00/2,00	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	4,00	0,50	0,25	0,75	PS	0,50/1,00	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	16,0	0,50	0,25	0,50	0,75	PS	4,00/0,25	109-150 / 1-8

^a Interpretação: Σ CIF $\leq$ 0,5 corresponde a sinergismo (S); Σ CIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); Σ CIF > 4,0 antagonismo (A); Σ CIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em μ g/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina $\geq$ 64 μ g/mL; gentamicina $\geq$ 16; ciprofloxacina $\geq$ 4 μ g/mL, ceftazidima $\geq$ 32 μ g/mL; imipenem $\geq$ 16 μ g/mL; ampicilina-sulbatam $\geq$ 32 μ g/mL; polimixina B $\geq$ 4 μ g/mL; tigeciclina $\geq$ 8 μ g/mL (ponto de corte FDA); vancomicina $\geq$ 16 μ g/mL e rifamicina $\geq$ 4 μ g/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa 28 OXA-143

Combinação A x B	CIM A(µg/mL)	CIM B(µg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF = CIF A+ CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(µg/mL) ^d
Imipenem x Gentamicina	128	16,0	0,50	0,0018	0,50	S	64,0/ 0,03	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	128	0,03	0,25	0,16	0,41	S	32,0/ 0,005	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	512	4,00	0,25	0,25	0,50	S	128/1,00	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	128	64,0	0,25	0,12	0,37	S	32,0/8,00	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	256	0,06	0,25	0,16	0,41	S	64,0/0,01	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	128	0,50	0,001	0,50	S	0,50/0,25	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	64,0	32,0	0,25	0,25	0,50	S	16,0/8,00	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	16,0	256	0,12	0,50	0,62	PS	2,00/128	4,6 / 15-30
Polimixina B x Vancomicina	0,50	128	0,24	0,50	0,74	PS	0,12/64,0	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	256	8,00	0,25	0,50	0,75	PS	64,0/4,00	15-30 /4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,12	8,00	0,50	0,06	0,56	PS	0,06/0,50	0,63 /4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	64,0	8,00	0,50	0,0006	0,50	S	32,0/0,005	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	8,00	0,12	0,50	0,62	PS	0,12/16,0	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	8,00	1,00	0,25	0,50	0,75	PS	0,25/4,00	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em µg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64µg/mL; gentamicina ≥16; ciprofloxacina ≥4µg/mL, ceftazidima ≥ 32µg/mL; imipenem ≥ 16µg/mL; ampicilina-sulbatam ≥ 32µg/mL; polimixina B ≥4µg/mL; tigeciclina ≥ 8µg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16µg/mL e rifamicina ≥ 4µg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa 1031 OXA-143/23

Combinação A x B	CIM A(µg/mL)	CIM B(µg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF = CIF A+ CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(µg/mL) ^d
Imipenem x Gentamicina	64,0	0,50	0,25	0,12	0,37	S	16,0/0,06	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	1024	0,25	0,003	0,49	0,49	S	4,00/0,12	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	256	16,0	0,50	0,25	0,75	PS	64,0/8,00	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	512	256	0,25	0,12	0,37	S	128/32,0	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	128	0,06	0,12	0,16	0,28	S	16,0/0,01	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	128	0,25	0,25	0,50	S	0,25/32,0	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	2,00	128	0,06	0,25	0,50	S	0,50/32,0	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	64,0	512	0,06	0,50	0,56	S	2,00/0,12	4,6 / 15-30
Polimixina B x Vancomicina	0,50	256	0,50	0,12	0,62	PS	0,25/32,0	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	512	4,00	0,25	0,50	0,75	PS	128/2,00	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,25	4,00	0,24	0,50	0,74	PS	0,06/2,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	64,0	4,00	0,25	0,50	0,75	PS	16,0/2,00	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	16,0	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/2,00	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	64,0	0,25	0,50	0,48	0,98	I	32,0/0,12	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em µg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64µg/mL; gentamicina ≥16; ciprofloxacina ≥4µg/mL, ceftazidima ≥ 32µg/mL; imipenem ≥ 16µg/mL; ampicilina-sulbatam ≥ 32µg/mL; polimixina B ≥4µg/mL; tigeciclina ≥ 8µg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16µg/mL e rifamicina ≥ 4µg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa 81 OXA-143/23

Combinação A x B	CIM A(μg/mL)	CIM B(μg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF = CIF A+ CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(μg/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	32,0	128	1,00	0,0002	1,00	I	0,12/8,00	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	64,0	0,50	0,06	1,00	1,06	I	4,00/0,50	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	128	32,0	0,25	0,25	0,50	S	32,0/4,00	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	256	64,0	0,12	0,25	0,37	S	32,0/16,0	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	1024	0,50	0,06	0,50	0,56	PS	64,0/0,25	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	0,50	32,0	0,12	1,00	1,12	I	0,06/32,0	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	128	1024	0,50	0,50	1,00	I	64,0/512	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	256	32,0	0,01	1,00	1,01	I	4,00/32,0	15-30 / 4,6
Polimixina B x Vancomicina	1,00	256	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/32,0	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	64,0	2,00	1,00	0,01	1,01	I	64,0/0,03	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	1,00	4,00	0,25	0,50	0,75	PS	0,06/2,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	4,00	0,50	0,25	0,75	PS	16,0/1,00	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	4,00	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/0,50	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	128	0,50	0,03	1,00	1,03	I	4,00/0,50	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em μg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64μg/mL; gentamicina ≥ 16; ciprofloxacina ≥ 4μg/mL, ceftazidima ≥ 32μg/mL; imipenem ≥ 16μg/mL; ampicilina-sulbatam ≥ 32μg/mL; polimixina B ≥ 4μg/mL; tigeciclina ≥ 8μg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16μg/mL e rifamicina ≥ 4μg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa 1 OXA-58

Combinação A x B	CIM A(µg/mL)	CIM B(µg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF=CIF A+CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(µg/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	128	4,00	0,25	0,25	0,50	S	32,0/1,00	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	256	0,25	0,25	0,12	0,37	S	64,0/0,03	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	128	32,0	0,25	0,50	0,75	PS	32,0/16,0	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	256	8,00	0,25	0,25	0,50	S	64,0/2,00	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	512	0,06	0,25	0,50	0,75	PS	128/0,03	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	32,0	0,50	0,03	0,53	PS	0,50/2,00	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	4,00	128	0,25	0,25	0,50	S	1,00/32,0	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	64,0	128	0,50	0,12	0,62	PS	8,00/64,0	15-30 / 4,6
Polimixina B x Vancomicina	1,00	256	0,50	0,50	1,00	I	0,50/128	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	256	4,00	0,06	0,50	0,56	PS	16,0/2,00	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,50	4,00	0,50	0,50	1,00	I	0,25/2,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	4,00	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/0,50	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	4,00	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/0,50	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	64,0	1,00	0,06	0,50	0,56	PS	4,00/0,50	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em µg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64µg/mL; gentamicina ≥ 16; ciprofloxacina ≥ 4µg/mL, ceftazidima ≥ 32µg/mL; imipenem ≥ 16µg/mL; ampicilina-sulbatam ≥ 32µg/mL; polimixina B ≥ 4µg/mL; tigeciclina ≥ 8µg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16µg/mL e rifamicina ≥ 4µg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa 4347 OXA-72								
Combinação A x B	CIM A(μg/mL)	CIM B(μg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF=CIF A+CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(μg/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	64,0	8,00	0,25	0,25	0,50	S	16,0/2,00	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	128	0,25	0,25	0,24	0,49	S	32,0/0,06	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	256	32,0	0,12	0,25	0,37	S	8,00/32,0	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	128	32,0	0,25	0,50	0,75	PS	32,0/16,0	15-30 / 0,63
Ceftazidima x Tigeciclina	256	0,06	0,12	0,50	0,62	PS	32,0/0,03	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	32,0	0,25	0,25	0,50	S	0,25/8,00	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	4,00	64,0	0,03	0,50	0,50	S	0,12/32,0	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	64,0	256	0,25	0,25	0,50	S	16,0/64,0	15-30 / 4,6
Polimixina B x Vancomicina	1,00	256	0,50	0,0009	0,50	S	0,50/0,25	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	256	16,0	0,003	0,50	0,50	S	2,00/8,00	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,50	4,00	0,50	0,25	0,75	PS	0,25/1,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	4,00	0,50	0,25	0,75	PS	16,0/1,00	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	1,00	8,00	0,50	0,25	0,75	PS	0,50/2,00	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	128	1,00	0,03	0,50	0,53	PS	4,00/0,50	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em μg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64μg/mL; gentamicina ≥16; ciprofloxacina ≥4μg/mL, ceftazidima ≥ 32μg/mL; imipenem ≥ 16μg/mL; ampicilina-sulbatam ≥ 32μg/mL; polimixina B ≥4μg/mL; tigeciclina ≥ 8μg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16μg/mL e rifamicina ≥ 4μg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa LDC OXA-23

Combinação A x B	CIM A(μg/mL)	CIM B(μg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF=CIF A+CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(μg/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	128	64,0	0,25	0,25	0,50	S	32,0/16,0	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	128	0,12	0,06	0,50	0,56	S	8,00/0,06	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	256	32,0	0,25	0,25	0,50	S	8,00/32,0	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	256	512	0,50	0,25	0,75	PS	128/128	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	64,0	0,06	0,12	0,16	0,28	S	8,0/0,01	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	128	0,50	0,12	0,62	PS	0,50/16,0	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	64,0	64,0	0,25	0,06	0,31	S	4,00/16,0	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	16,0	256	0,25	0,25	0,50	S	4,00/64,0	15-30 / 4,6
Polimixina B x Vancomicina	0,25	64,0	0,48	0,06	0,54	PS	0,12/32,0	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	256	32,0	0,25	0,50	0,75	PS	64,0/16,0	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,06	8,00	0,16	0,50	0,66	PS	0,01/4,00	0,63 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	4,00	0,25	0,50	0,75	PS	8,00/2,00	109-150 / 4-32
Polimixina B x Rifampicina	0,50	8,00	1,00	0,01	1,00	I	0,50/0,12	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	32,0	0,50	0,50	0,50	1,00	I	16,0/0,25	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em μg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64μg/mL; gentamicina ≥ 16; ciprofloxacina ≥ 4μg/mL, ceftazidima ≥ 32μg/mL; imipenem ≥ 16μg/mL; ampicilina-sulbactam ≥ 32μg/mL; polimixina B ≥ 4μg/mL; tigeciclina ≥ 8μg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16μg/mL e rifamicina ≥ 4μg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Cepa HC OXA-23								
Combinação A x B	CIM A(µg/mL)	CIM B(µg/mL)	CIF A	CIF B	ΣCIF=CIF A+CIF B	Interpretação ^a	Ponto (A/B) ^b	Pico Plasmático(µg/mL) ^c
Imipenem x Gentamicina	128	16,0	0,25	0,125	0,37	S	32,0/2,00	40 / 4-10
Amicacina x Tigeciclina	128	0,25	0,25	0,50	0,75	PS	32,0/0,12	15-30 / 0,63
Amicacina x Ampicilina/Sulbactam	128	16,0	0,25	0,25	0,50	S	1,00/4,00	15-30 / 109-150
Amicacina x Imipenem	32,0	64,0	0,50	0,25	0,75	PS	32,0/8,00	15-30 / 40
Ceftazidima x Tigeciclina	512	0,06	0,06	0,50	0,56	PS	32,0/0,03	69 / 0,63
Polimixina B x Imipenem	1,00	128	0,25	0,06	0,31	S	0,25/8,00	1-8 / 40
Gentamicina x Ciprofloxacina	4,00	64,0	0,50	0,06	0,56	PS	2,00/4,00	4-10 / 4,6
Ciprofloxacina x Amicacina	32,0	64,0	0,12	0,50	0,62	PS	4,00/32,0	15-30 / 4,6
Polimixina B x Vancomicina	0,50	256	0,50	0,001	0,50	S	0,25/0,50	1-8 / 20-50
Amicacina x Rifampicina	256	8,00	0,50	0,50	1,00	I	128/4,00	15-30 / 4-32
Tigeciclina x Rifampicina	0,25	4,00	1,00	0,25	1,25	I	0,25/1,00	0,63/4-32
Ampicilina/Sulbactam x Rifampicina	32,0	2,00	0,50	0,50	1,00	I	16,0/1,00	109-150/4-32
Polimixina B x Rifampicina	4,00	8,00	0,25	0,03	0,28	S	1,00/0,25	1-8 / 4-32
Ampicilina/Sulbactam x Polimixina B	128	0,12	0,03	0,50	0,53	S	4,00/0,06	109-150 / 1-8

^a Interpretação: ΣCIF ≤ 0,5 corresponde a sinergismo (S); ΣCIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); ΣCIF > 4,0 antagonismo (A); ΣCIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). ^b Valores do ponto A/B são expressos em µg/mL; ^c Picos Plasmáticos de acordo com The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy 2010. Ponto de corte para definir resistência (CLSI, 2012): amicacina ≥ 64µg/mL; gentamicina ≥ 16; ciprofloxacina ≥ 4µg/mL, ceftazidima ≥ 32µg/mL; imipenem ≥ 16µg/mL; ampicilina-sulbactam ≥ 32µg/mL; polimixina B ≥ 4µg/mL; tigeciclina ≥ 8µg/mL (ponto de corte FDA); vancomicina ≥ 16µg/mL e rifamicina ≥ 4µg/mL (ponto de corte de *Staphylococcus aureus* CLSI 2012)

Os critérios de avaliação utilizados na seleção das melhores combinações *in vitro* foram a presença de efeito sinérgico entre as combinações de ATBs testados e diminuição dos valores da CIM em combinação, para valores menores que os pontos de corte que definem resistência, *in vitro*, indicados para cada ATB da associação assim como, a queda da CIM 4 – 10 vezes abaixo do valor do pico plasmático (C_{max}) definido para cada ATB (Greenwood, 2000).

As combinações que apresentaram efeito sinérgico ($S = \Sigma CIM \leq 0,5$) e parcialmente sinérgico ($PS = \Sigma CIF \ 0,5-0,75$) entre dois antimicrobianos foram: amicacina/tigeciclina, polimixina B/imipenem, amicacina/ampicilina-sulbactam, polimixina B/vancomicina, polimixina B/rifampicina, ampicilina-sulbactam/rifampicina.

Para uma análise mais detalhada, com ênfase na seleção das combinações sinérgicas com potencial terapêutico, a Tabela 5 apresenta os resultados da somatória dos índices de Concentração Inibitória Fracional (ΣCIF) com valores organizados segundo o *score* sinérgico/parcialmente sinérgico.

Na tabela 5, Combinações cujas CIMs foram 4 -10 vezes inferiores aos picos plasmáticos máximos (C_{max}) e categorizados dentro de um critério interpretativo, CLSI, não resistente, foram destacados em caixas cinza ou preto representando combinações antibacterianas com maior chance de sucesso, *in vivo*, considerando aspectos farmacocinéticos.

Tabela 5: Somatório dos índices de Concentração Inibitória Fracional (Σ CIF) para combinações antibacterianas com potencial terapêutico organizado segundo o score sinérgico/parcialmente sinérgico definindo maior atividade

Combinação de Antibacterianos ^a	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> (bla_{OXA}) ^b								Score S/PS (%) ^c	
	804 (OXA-143)	28 (OXA-143)	1031 (OXA-143/23)	81 (OXA-143/23)	1 (OXA-58)	4347 (OXA-72)	LDC (OXA-23)	HC (OXA-23)	Σ FIC $\leq 0,5$	Σ FIC $> 0,5$ e $\geq 0,75$
AK x TGC	0,33^c	0,41	0,49	1,06	0,37	0,49	0,56	0,75	4 (50)	2 (25)
PB x IPM	0,56	0,50	0,50	1,12	0,53	0,50	0,50	0,31	3 (38)	1 (13)
AK x SAM	0,50	0,56	0,75	0,62	0,75	0,37	0,37	0,50	2 (25)	2 (25)
PB x VAN	0,75	0,74	0,62	0,62	1,00	0,50	0,54	0,50	2 (25)	0
CAZ x TGC	0,45	0,41	0,29	0,62	0,75	0,62	0,28	0,56	2 (25)	0
PB x RIF	0,75	0,62	0,62	0,62	0,62	0,75	1,00	0,28	1 (13)	5 (63)
CIP x AK	0,13	1,50	0,56	1,00	0,62	0,50	0,50	0,62	1 (13)	1 (13)
AK x IPM	0,50	0,37	0,37	0,37	0,51	0,75	0,75	0,75	1 (13)	1 (13)
AK x RIF	0,75	0,75	0,75	1,01	0,56	0,50	0,75	1,00	1 (13)	1 (13)
GEN x CIP	0,50	1,00	0,50	1,00	0,50	0,50	0,31	0,56	1 (13)	0
SAM x RIF	0,75	0,50	0,75	0,75	0,62	0,75	0,75	1,00	0	6 (75)
SAM x PB	0,75	0,75	0,98	1,00	0,56	0,53	1,00	0,53	0	4(50)
TGC x RIF	1,25	0,56	0,74	0,75	1,00	0,75	0,66	1,25	0	4 (50)
IPM x GEN	0,50	0,50	0,75	1,00	0,50	0,50	0,50	0,37	0	0

^a AK- amicacina, TGC- tigeciclina, PB polimixina B, IPM imipenem, SAM ampicilina-sulbactam, VAN- vancomicina, CAZ- ceftazidima, CIP- ciprofloxacina, GEN- gentamicina, RIF- rifampicina. ^b interpretação do índice Σ CIF: $\leq 0,5$, sinérgico (caixa preta); Σ CIF = 0,75 parcialmente sinérgico (caixa cinza); Σ CIF entre 1,0 - 4,0 indiferente. ^c score define o número de isolados cuja Interpretação da combinação ATB foi classificada como S ou PS. Quadros preto ou cinza definem isolados cuja CIM na combinação teve uma queda para um nível de ponto de corte, CLSI, classificando isolados como não resistentes (CLSI, 2012).

4.2 Concentração Mínima Letal (CML):

A CML foi padronizada utilizando o método de resazurina 0,01%, o qual foi validado pelo crescimento bacteriano macroscopicamente visível em meio não seletivo. Na figura 7 é apresentada a leitura do ensaio CML para a combinação polimixina B/imipenem. Fundo rosa apresenta crescimento bacteriano e fundo azul não apresenta crescimento bacteriano.

Figura 7. Cálculo da CIF. CIF = CIM A combinação / CIM A não combinada.

X – CIFA = 0,12/0,5 CIFA = 0,24 CFB = 32/256 CFB = 0,12 Σ CIF=CIFA+CFB Σ CIF=0,24+0,12 Σ CIF=0,36

Y – CIFA = 0,12/ 0,5 = 0,24 CFB = 64/256 = 0,25 CFB=0,49 Σ CIF=CIFA+CFB Σ CIF=0,24+0,25 Σ CIF=0,49

Z - CIFA = 0,06/ 0,5 = 0,12 CFB = 64/256 = 0,25 CFB=0,49 Σ CIF=CIFA+CFB Σ CIF=0,12+0,25 Σ CIF=0,49

Σ CIF: $\leq 0,5$, sinergismo.

A CML apresentou uma variação média de uma diluição acima CIM para cada antimicrobiano.

4.3 Estudo do time-kill:

As figuras 8 e 9 apresentam os resultados das curvas de morte em função do tempo (h) de interação. As concentrações utilizadas para fazer este ensaio foram obtidas através da CML de cada amostra. Contemplando o potencial clínico de aplicação, *in vivo*, e considerando um alto *score S* e *PS*, as combinações escolhidas para este ensaio foram polimixina B/ imipenem e polimixina B/ vancomicina.

Para algumas cepas foram construídas mais de uma curva de morte, pois a CML sugestiva de efeito sinérgico foi observada em diferentes concentrações de cada combinação (tabela 6).

Tabela 6: Cepas com mais de um curva de morte x tempo e respectivos Σ CIF

Cepa	Concentração de ATM no ponto sinérgico	Σ CIF	Tempo (h) para atingir atividade bactericida
28	0,5 μ g/mL de PB ¹ + 0,25 μ g/mL de IPM	0,50	2
	0,5 μ g/mL de PB + 1 μ g/mL de IPM	0,50	2
1	0,5 μ g/mL de PB + 2 μ g/mL de IPM	0,56	4
	0,5 μ g/mL de PB + 4 μ g/mL de IPM	0,62	2
4347	0,25 μ g/mL de PB + 8 μ g/mL de IPM	0,50	4
	0,25 μ g/mL de PB + 16 μ g/mL de IPM	0,75	2
HC	0,25 μ g/mL de PB + 8 μ g/mL de IPM	0,31	4
	0,25 μ g/mL de PB + 16 μ g/mL de IPM	0,37	4
	0,25 μ g/mL de PB + 32 μ g/mL de IPM	0,50	2
1031	0,25 μ g/mL de PB + 32 μ g/mL de VAN	0,62	1
	0,25 μ g/mL de PB + 64 μ g/mL de VAN	0,75	1
HC	0,25 μ g/mL de PB + 0,5 μ g/mL de VAN	0,50	4
	0,06 μ g/mL de PB + 128 μ g/mL de VAN	0,624	4

¹ IPM imipenem; PB polimixina B; VAN vancomicina

Figura 8: Gráficos de cinética de crescimento em função do tempo da combinação polimixina B x imipenem: A) cepa 804; B) cepa 28; C) cepa 1031; D) cepa 81; E) cepa 1; F) cepa 4347; G) LDC; H) cepa HC.

Figura 9: Gráficos de cinética de crescimento em função do tempo da combinação polimixina B x vancomicina: A) cepa 1031; B) 4347; C) HC. Cada ensaio foi realizado em duplicata sendo que cada ponto corresponde à média.

A partir dos resultados obtidos nas cinéticas de curva de morte x tempo, é possível determinar a potência *in vitro* da combinação PB x IPM contra as amostras de *A. baumannii* MRs produtoras de oxacilinases, através da contagem de bactérias vivas ao longo do tempo de exposição à combinação. Já na primeira hora de interação da bactéria com a combinação de PB x IPM a contagem bacteriana de células viáveis teve uma queda > 93%.

Tabela 7: Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com PB x IPM

Cepa <i>A. baumannii</i>	% Viabilidade bacteriana em função do tempo de interação (h)			
	1 h	2 h	4h	8 h
804	1,36	0,31	0,00	0,00
28	0,16	<0,001	0,00	0,00
1031	7,33	0,25	0,00	0,00
81	22	0,015	<0,001	0,00
1	4,08	0,00	0,00	0,00
4347	3,46	1,45	<0,001	0,00
LDC	0,4	<0,001	0,00	0,00
HC	0,37	0,02	0,00	0,00

* O inóculo inicial no ensaio foi 1×10^5 UFC/mL (cada poço da microplaca). Os valores correspondem à média de 2 ensaios independentes.

A tabela 8 apresenta a porcentagem de viabilidade relacionada à potência *in vitro* da combinação PB x VAN contra as amostras de *A. baumannii* MRs produtoras de oxacilinases. A contagem bacteriana de células viáveis, na segunda hora de interação teve uma queda >91%.

Tabela 8: Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com PB x VAN

Cepa <i>A. baumannii</i>	% Viabilidade bacteriana em função do tempo de interação (h)			
	1 h	2 h	4h	8 h
1031	0,26	0,00	0,00	0,00
4347	12	7,75	0,01	0,00
HC	43,86	9,37	0,00	0,00

* O inóculo inicial no ensaio foi 1×10^5 UFC/mL (em cada poço da microplaca).

4.4 Teste confirmatório de sinergismo pelo método ágar diluição modificado e método epsilmétrico.

A tabela 8 apresenta os resultados do ensaio de disco difusão modificada utilizando discos de imipenem, vancomicina e rifampicina colocados sobre a superfície de uma placa de ágar MH contendo uma concentração sub-inibitória (CIM/2 e CIM/4) de polimixina B. Para rifampicina foi observado um aumento do halo de inibição inferindo na potencialização do antimicrobiano (Figura 7).

Este efeito sinérgico também foi demonstrado utilizando o método epsilométrico. Como observado na figura 7, a CIM do imipenem para a cepa *A. baumannii* 4347 OXA-72 positiva teve uma queda de 16 µg/mL para 2 µg/mL em ágar MH suplementado com 0,25 µg/mL de polimixina B (CIM/2). (Figura 7)

Tabela 9: Efeito combinado de antibacterianos avaliado pelo método de disco-difusão modificado utilizando placas de ágar MH contendo polimixina B CIM/2 .

Amostra	Disco-ATB	Halo (mm) sem ^a	Halo (mm) Com PB ^b	Aumento do halo de inibição (mm)	(Σ CIF) ^c
804	RIF	16	20	+4	0,75
28	RIF	18	23	+5	0,62
1031	RIF	14	20	+6	0,62
81	RIF	20	25	+5	0,62
1	RIF	22	24	+2	0,62
4347	RIF	19	21	+2	0,75
LDC	RIF	21	21	0	1,0
HC	RIF	18	21	+3	0,28

^a ATB- antimicrobiano, PB-polimixina B, RIF-rifampicina, IPM-imipenem, VAN-vancomicina.

^b concentração sub-inibitória.

^c determinado por *checkerboard*

a)

b)

c)

d)

Figura 10: Método de difusão do disco modificado e método epsilométrico modificado para avaliar efeito sinérgico. Aumento do halo de inibição na presença de polimixina B na concentração de 0,25µg/mL, pelo método de ágar diluição modificado (figuras a e b) indicando possível efeito sinérgico da polimixina com rifampicina ou com vancomicina ou imipenem. c) e d) efeito sinérgico da combinação polimixina B/imipenem, utilizando fita de E-test.

4.5 Atividade *in vivo* do efeito sinérgico em modelo murino de infecção sistêmica

A recuperação de bactérias dos órgãos (pulmão e baço) foi realizada pela semeadura deste material em meio seletivo ágar MacConkey. Segundo a figura abaixo, nos camundongos controles sem tratamento apenas com inóculo, foram recuperados do baço uma média de 160 UFC/g e 120 UFC/g do pulmão após 24h pós-inoculação de 1×10^8 UFC/ml da cepa de *A. baumannii* 804, produtora de OXA-143. Já no quinto dia após a inoculação foram recuperadas uma média de 15 e 225 UFC/g de baço e pulmão, respectivamente.

Já para os camundongos tratados com imipenem, ou polimixina B ou pela associação de imipenem com polimixina B, do primeiro ao quinto dia não houve isolamento de UFC/mL no baço e pulmão (Figura 8).

Figura 11: Número de UFC/gr de *A. baumannii*, recuperados dos órgãos avaliados: A) baço B) pulmão. Os animais foram inoculados com $1,8 \times 10^8$ UFC/mL da cepa de *A. baumannii* 804, produtora de OXA-143 e três grupos receberam tratamento. Houve diferença significativa entre o grupo controle infectado e não tratado e grupos infectados e tratados ($p \leq 0,05$).

Foi feita a análise histopatológica do pulmão de cada um dos animais eutanaziados dos grupos: controle negativos (não infectados), grupo controle positivo (infectados 9×10^7 UFC/animal), grupo PB (infectados 9×10^7 UFC/animal e tratados com 0,075 mg/kg/dia de polimixina B), grupo IPM (infectados 9×10^7 UFC/animal e tratados com 2,4 mg/kg/dia de imipenem) e grupo PB+IPM (infectados 9×10^7 UFC/animal e tratados com 0,075 mg/kg/dia de polimixina B combinado com 2,4 mg/kg/dia de imipenem) (Figura 12).

A figura 12A, evidencia a ausência de edema transudativo ou exsudativo, a integridade intersticial pulmonar, de parede bronquiolar e alveolar, ausência de enfisema ou atelectasia, congestão moderada com multifocos hemorrágicos discretos.

A figura 12B demonstra uma discreta hiperplasia de parede bronquiolar, ausência de edema transudativo ou exsudativo, integridade intersticial pulmonar, de parede bronquiolar e alveolar, ausência de enfisema ou atelectasia congestão moderada com multifocos hemorrágicos discretos.

A figura 12C mostra uma pneumonia intersticial difusa moderada de padrão linfoplasmocitário, congestão moderada com multifocos hemorrágicos moderados, moderado edema perivascular típico, no entanto sem infiltrado inflamatório local e discreta hiperplasia de parede bronquiolar.

A figura 12D evidencia pneumonia intersticial difusa moderada de padrão linfoplasmocitário, congestão moderada com multifocos hemorrágicos moderados e edema perivascular típico moderado, no entanto sem infiltrado inflamatório local.

A figura 12E apresenta uma pneumonia intersticial com padrão focal delimitado, áreas com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário denso, mas restrito

a focos peribronquiolares e alveolares. Início de fibroplasia e fibrose concomitante. Ausência de congestão, hiperplasia de nódulos linfoides (BALT: bronchial associated lymphoid tissue), e presença de hiperplasia de célula caliciforme (produtoras de muco).

A figura 12F demonstra o parênquima pulmonar absolutamente normal, dentro dos padrões histológicos do órgão.

Figura 12. Avaliação histopatológica de tecido pulmonar de camundongo infectados com 9×10^7 UFC/animal e tratados com: D) polimixina B, 0,075 mg/kg/dia administradas i.p. durante 3 dias. O pulmão foi coletado após 48h da última dose. Na figura, a letra “a” identifica os bronquíolos (hematoxilina-eosina 400x); E) imipenem, 2,4 mg/kg/dia administrado i.p. durante 3 dias. O pulmão foi coletado após 48h da última dose. Na figura, a letra “a” representa os bronquíolos, a letra “b” o nódulo linfóide, e a letra “c”, células caliciformes (hematoxilina-eosina 400x); F) polimixina B, 0,075 mg/kg/dia + imipenem, 2,4 mg/kg/dia administrados i.p. durante 3 dias. O pulmão foi coletado após 48h da última dose. Na figura, as letras “a” e “b” indicam os bronquíolos e vaso sanguíneo, respectivamente (hematoxilina-eosina 200x). A figura A e B representam cortes histopatológicos de pulmão obtidos de animais controles negativo (inoculado com NaCl 0,9% estéril) e positivo (camundongo infectados com 9×10^7 UFC/animal, sem receber tratamento). Os órgãos avaliados foram coletados após 24 (controle positivo) e 120 h (controle negativo) da inoculação. Em ambas as figuras o aumento utilizado foi 200x, onde as letras “a” e “b” representam os bronquíolos e vaso sanguíneo, respectivamente. A figura C representa o corte histológico do pulmão de um animal controle positivo, cujo órgão foi coletado 120 h após infecção. Na figura, as letras “a” e “b” indicam os bronquíolos e vaso sanguíneo, respectivamente (hematoxilina-eosina 400x).

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana de DDA contra cepas MRs de *A. baumannii* produtoras de oxacilinases:

A tabela 10 apresenta os resultados da avaliação da atividade de DDA e tigeciclina sozinhas e em combinação contra as cepas de *A. baumannii* estudadas. A CML para DDA foi 2 µg/mL em 4/5 amostras em 2 a 4 horas de interação. Já, a CML da tigeciclina variou entre 0,5 a 8 µg/mL. A combinação de DDA/tigeciclina teve um efeito sinérgico (Σ CIF = 0,5) contra 2 estirpes de *A. baumannii* produtoras de OXA-143 ou OXA-23, respectivamente, ao passo que foi observado um efeito indiferente (Σ CIF = 1,0) contra os isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-58, OXA-23/-143, OXA-23 ou OXA-72.

Tabela 10: Concentração bactericida mínima e efeito sinérgico de DDA e tigeciclina contra cepas de *A. baumannii* produtoras de oxacilinases.

Amostra (OXA)	CML ^a TIG	CML DDA	CIF ^b TIG	CIF DDA	Σ CIF ^d = CIF(TIG)+ CIF(DDA)	TIG/DDA ^c	Interpretação ^e
1 (143/23)	1	2	0,01	1,00	1,00	0,01/2,00	I
804 (143)	0,5	8	0,02	0,50	0,50	0,01/4,00	S
81 (143/23)	8	2	0,001	1,00	1,00	0,01/2,00	I
LDC (23)	1	2	0,01	0,50	0,50	0,01/1,00	S
HC (23)	2	2	0,005	1,00	1,00	0,01/2,00	I

^a Concentração Bactericida Mínima (µg/mL). ^b Concentração Inibitória Fracional (Cálculo do CIF = CIM combinação / CIM sozinho; ^c CIM em Combinação, ^d Σ CIF: Soma das CIFs; ^e Interpretação: Σ CIF $\leq$ 0,5 corresponde como sinergismo (S); Σ CIF = 0,75 parcialmente sinérgico (PS); Σ CIF > 4,0 antagonismo (A); Σ CIF entre 1,0 - 4,0 indiferente (I). Os valores representam a média de dos ensaios independentes

Figura 13: Gráficos de cinética de crescimento (curva de morte) em função do tempo na presença e ausência de DDA ug/mL, tigeciclina, e DDA/tigeciclina. A) cepa 1 (OXA-143/23); B) cepa 804 (OXA-143); C) cepa 81(OXA-143/23); D) cepa LDC (OXA-23); E) cepa HC (OXA-23). Os valores representam a média de 2 ensaios independentes.

A tabela apresenta a porcentagem de viabilidade de cepas MRs de *A. baumannii* na presença da combinação DDA/tigeciclina. A partir de segunda hora de interação da bactéria com a combinação de DDAB/tigeciclina a contagem bacteriana teve uma queda >92%.

Tabela 11: Porcentagem de viabilidade bacteriana após interação com DDA/Tigeciclina*

Cepa de <i>A. baumannii</i> (OXA)	% Viabilidade Bacteriana em função do tempo de interação (h)				
	1 h	2 h	4h	8 h	24 h
1 (143/23)	66,19	1,51	1,37	0,22	0,04
804 (143)	3,60	1,68	0,19	0,00	0,00
81 (143/23)	52,30	3,90	0,29	0,04	0,00
LDC (23)	21,86	7,65	2,19	1,64	0,11
HC (23)	99,11	0,71	0,00	0,00	0,00

* O inóculo inicial no ensaio foi 1×10^5 UFC/mL (cada poço da microplaca). Os valores representam a média de 2 ensaios independentes.

5- DISCUSSÃO

O panorama atual da multirresistência em bactérias de importância médica tem levantado a necessidade de procurar novas alternativas de tratamento, uma vez que, a indústria farmacêutica tem descontinuado a pesquisa de novas drogas. Como opção, tem sido postulado que uso de antibacterianos utilizados no passado, não considerados nos atuais esquemas terapêuticos, possam ser reutilizados como é o caso da fosfomicina ou a polimixina B. Este último composto, embora efetivo, tem o inconveniente da nefrotoxicidade, por este motivo seu uso tem sido discutido (Levin *et al*, 2003). No caso de *A. baumannii*, as polimixinas e/ou ampicilina-sulbactam tem sido os únicos antibióticos que tem apresentado atividade, *in vitro*, em esquemas monoterápicos (Levin *et al*, 2003). Uma segunda opção tem sido o uso de terapias combinadas na procura do efeito sinérgico. O grande problema é que muitas vezes o efeito sinérgico resultante da combinação de dois ou mais antibacterianos é específico para uma espécie bacteriana exibindo um mecanismo de resistência determinado, o que faz necessário o estudo de várias combinações contra diferentes cepas expressando diferentes mecanismos de resistência, para extrapolar o uso de uma combinação com potencial terapêutico.

O *checkerboard* e *time-kill* são os métodos para avaliação do efeito sinergismo, *in vitro*, mais utilizados na pesquisa de combinações de antimicrobianos. Ambos métodos são um complemento. Enquanto o *checkerboard* avalia a atividade inibitória o *time-kill* avalia a atividade bactericida e a potencia relacionada à atividade em função do tempo (Bonapace *et al.*, 2000).

Primeiramente o teste de *checkerboard* foi aplicado em apenas duas cepas escolhidas aleatoriamente. As combinações antimicrobianas que obtiveram efeito S ou PS foram selecionadas para que as demais cepas fossem testadas.

O critério utilizado para a interpretação do efeito resultante da combinação de antimicrobianos foi baseado no cálculo do índice Σ CIF. Quando o valor calculado é $\leq 0,50$ é considerado sinérgico, e $>4,00$ é considerado antagônico. Contudo, existe uma divergência entre autores sobre os valores considerados parcialmente sinérgicos, aditivos ou indiferentes. Para Marques e colaboradores (1997), Kiffer *et.al*, (2005) e Timurkaynak e colaboradores (2006) o critério parcialmente sinérgico considerou um valor do Σ CIF $>0,5-1$; aditivo $=1$, e indiferente aditivo entre >1 e ≤ 4 indiferente. Já outros estudo tem modificado o critério indiferente/aditivo para $>0,5-\leq 4$ o que previamente foi definido por Odds como efeito sem interação (Odds, 2003) (Bonapace *et al*,2000; Petersen *et al*, 2006; Sheng *et al*, 2011).

O critério utilizado no presente estudo foi adaptado do estudo de Fernández Cuenca *et al.*, 2003, o Σ CIF $\leq 0,5$ corresponde a um efeito sinérgico, Σ CIF $>0,5$ e $\leq 0,75$ corresponde a um efeito parcialmente sinérgico, enquanto que um Σ CIF maior a 4,0 corresponde a antagonismo, e um Σ CIF entre 0,75 - 4,0, corresponde à indiferença (Hall *et al.*, 1983, Fernández-Cuenca *et al.*, 2003). Este critério foi adotado uma vez que existem controvérsias para aplicar o critério de Odds para baterias MRs, considerando que qualquer aumento de atividade provido por um segundo agente tanto sinérgico como parcialmente sinérgico pode ser clinicamente importante (Yoon *et al.*, 2006; Wareham & Bean, 2006).

Os resultados apresentados reportam que, de fato, algumas combinações de antibacterianos podem ter um efeito sinérgico contra *A. baumannii* produtor de oxacilinases.

Como resultado, a combinação amicacina/tigeciclina apresentou atividade S contra 4 (50%) cepas produtoras de OXA-143 ou OXA-72, e PS para 2 cepas (25%) produtoras de OXA-23, respectivamente. Petersen e col. e Príncipe e col. preconizaram que esta combinação foi sinérgica para alguns isolados, mostrando uma consistência entre os dados apresentados na literatura com os dados apresentados neste trabalho, apesar de não utilizarem o conceito PS (Petersen *et al.*, 2006; Príncipe *et al.*, 2009).

Por outro lado, a combinação polimixina B/imipenem apresentou atividade S e PS contra 3 (37,5%) isolados OXA-143, OXA-23 e OXA-72 positivos, e 1 (12,5%) isolado produtor de OXA-58, respectivamente. Yoon e col. reportaram um efeito sinergismo desta combinação contra 7/8 (88%) cepas de *A. baumannii* MRs não produtoras de oxacilinases, enquanto que Wareham & Bean incluíram cepas produtoras de OXA-23, também reportando efeito sinergismo para essa combinação, mas apenas para 1 das 5 cepas testadas no estudo (Yoon *et al.*, 2003; Wareham & Bean, 2006).

A combinação amicacina/ampicilina-sulbactam foi S contra 2 (25%) *A. baumannii* OXA-143 e OXA-23 positivos, sendo PS contra 2 (25%) *A. baumannii* OXA-58 e OXA-143/23 positivos. No estudo feito por Savov e col., para esta combinação, foi descrito um efeito S ou PS para 51/52 das cepas estudadas (Savov *et al.*, 2002), enquanto que Marques e col. reportaram um efeito S e PS para 3/12 e 8/12 cepas de *A. baumannii*, respectivamente (Marques *et al.*, 1997).

A combinação de polimixina B/vancomicina foi S contra 2 cepas (25%) produtoras de OXA-72 e OXA-23. Segundo Gordon e col., o uso combinado de polimixina E (colistina) com glicopeptídeos tem mostrado resultados promissores (Gordon *et al.*, 2010b). Como fundamento, a polimixina B pode alterar a integridade da membrana externa da bactéria gram-negativa facilitando a ação da vancomicina na ausência da sua barreira física natural em bactérias gram-negativas. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, Hornsey e col. (2011; 2012) tem pesquisado o uso combinado de glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos (como vancomicina, teicoplanina ou telavancina) com colistina, trazendo resultados interessantes de efeito sinérgico, *in vitro*. Por este motivo optamos por testar a combinação polimixina B/vancomicina, até agora não descrita, sendo que no Brasil o uso de polimixina B tem predominado sobre o uso de colistina (Levin *et al.*, 1999). Das cepas testadas apenas 2/8 (25%) foram compatíveis com um efeito sinérgico, com diminuição de até 4 vezes a CIM, abaixo dos valores da C_{max} de ambas as drogas.

Curiosamente, a combinação ampicilina-sulbactam/rifampicina apresentou atividade PS contra 6 (75%) cepas produtoras das variantes OXA-23, OXA-143, OXA-72 ou OXA-58. Este efeito PS não tem sido descrito, de fato a atividade S de rifampicina contra *A. baumannii* tem sido relacionada ao uso combinado de colistina ou tigeciclina (Giamarellos *et al.*, 2001; Peck *et al.*, 2012). Neste estudo, a combinação de rifampicina com polimixina B foi sinérgica para uma cepa OXA-23 e PS para 5/8 (62,5%) cepas produtoras de OXA-72, OXA-58, OXA-23/-OXA143 ou OXA-143.

Algumas combinações não demonstraram sinergismo ou efeito parcialmente sinérgico. Em alguns casos embora o índice Σ CIF foi $> 0,75$, as CIMs no ponto da combinação se manteve abaixo da C_{max} reportada.

Nos ensaios de *checkerboard*, algumas combinações apresentaram mais de um ponto de combinação com um Σ CIF S ou PS. Assim, ambos pontos foram submetidos à análise de curva de morte, sendo que o aumento da CIM de um ATB em combinação, embora possa resultar na mudança do efeito S para PS a potencia da combinação aumenta, diminuindo o tempo (h) necessário para atingir o efeito bactericida, o que pode ser observado nas figuras 8 e 9, e tabela 6.

Na análise das curvas de morte x tempo, o comportamento destas curvas para PB/IPM se mostrou semelhantes entre as oito cepas, demonstrando que em 4 horas de interação o efeito bactericida (99,9%) pode ser atingido. Para a combinação PB/VAN os resultados foram similares, denotando um potencia idêntica para ambas combinações apresentando efeito S ou PS.

Para confirmar o efeito sinérgico ou PS foram feitos testes pelo método de difusão do disco modificado e pelo método epsilométrico, confirmando tal efeito. Especificamente, no caso do método de DD modificado, os resultados foram apresentados exclusivamente para rifampicina, uma vez que, o uso de discos contendo imipenem ou vancomicina não apresentou diferenças no aumento dos halos de inibição nas placas contendo ágar MH com uma concentração sub-inibitória de polimixina B. Muito provavelmente, esta falta de correlação foi devida ao fato de que o imipenem tem uma concentração fixa de 10 μ g por disco, sendo assim facilmente hidrolisado pela produção das oxacilinasas. Para vancomicina esta falta de correlação pode ser decorrente do problema de baixo coeficiente de difusão, no caso 0,72 mm^2/hr para vancomicina (Cavenaghi

et. al, 1992). O uso do método de disco difusão modificado não sido descrito. Assim, no princípio foi elaborado para ter uma informação sobre possíveis efeitos sinérgicos que poderiam ser testados por métodos quantitativos confirmatórios. De interesse é o fato que o método é de fácil execução e de baixo custo, permitindo testar um grande número de discos antibióticos. No futuro, este método, aparentemente promissor, deverá ser aprimorado baseado na escolha da CIM sub-inibitória mais apropriada para testar discos antibióticos que não apresentem problemas de difusão como o caso da rifampicina. Este método será avaliado em comparação com a determinação da Σ CIM para definir critérios de interpretação qualitativos para efeito *S* e *PS*, baseado no aumento no diâmetro dos halos de inibição.

O método epsilométrico foi baseado no trabalho de Wareham e colaboradores (2011) que mostra a interação de ATBs através da diminuição da CIM da fita de *E-test* (A) quando adicionado a um meio suplementado com uma dose sub-inibitória da CIM de um ATB (B).

Aqui no Brasil tivemos apenas dois estudos de associação de ATBs *in vitro* para *A. baumannii*, mas sem qualquer *screening* para cepas produtoras de carbapenemases. Os estudos de Kiffer e colaboradores (2005) e Guelfi e colaboradores (2008), indicaram que mais ou menos 50% dos isolados testados responderam, *in vitro*, ao efeito *PS* obtidos pelo uso combinado de meropenem/polimixina B e meropenem/sulbactam.

A avaliação, *in vitro*, dos nanofragmentos de DDA sozinho o combinado com tigeciclina foi efetivo e promissor. Uma concentração $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ foi suficiente para atingir atividade bactericida contra isolados produtores de oxacilinases, em 2 – 4 horas de interação. Já, seu uso combinado foi específico para associar

tigeciclina, muito provavelmente pela interação hidrofóbica de ambas drogas (Turano *et al.*, 2012) uma vez que ambos compostos possuem cargas positivas que interferem na possibilidade de acontecer uma incorporação mediada pela interação eletrostática. O uso de DDA tem limitações para utilização sistêmica (Lincopan *et.al*, 2006b), tendo uma máxima utilidade no uso tópico, incluindo sistema de administração aérea como uso aerossol ou nebulizador, o que é de utilidade para infecções de trato respiratório, principal infecção associada com *A. baumannii* (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

Como originalidade científica, visando contribuir com um problema endêmico em hospitais brasileiros, o diferencial deste trabalho é a utilização de cepas de *A. baumannii* com perfil MR, produtores de oxacilinas altamente prevalentes como OXA-23 e OXA-143.

Após a determinação das combinações sinérgicas *in vitro*, foi selecionada a combinação mais favorável para seguir com a avaliação sinérgica *in vivo*. No caso, a combinação escolhida foi polimixina B/imipenem, esta escolha é devido a uma maior compatibilidade da associação como regime terapêutico com potencial uso clínico, *a priori*. Como cepa modelo, foi selecionado um isolado produtor de OXA-143 devido a sua emergente importância em hospitais brasileiros, parceiros do presente estudo.

A forma de avaliação *in vivo* da associação de ATBs foi realizada através do estudo histopatológico, o que não é comum na pesquisa de sinergismo ATB, apenas um trabalho publicado por Chiang e colaboradores (2009) mostram esta estratégia de avaliação, porém, neste trabalho não foi definido o mecanismo de resistência da cepa avaliada. Por outro lado, foi avaliado o efeito da associação de Imipenem/cilastatina + sulbactam, administrados de forma intratraqueal

(Chiang *et al.* 2009). Adicionalmente, o uso da histopatologia como ferramenta visou diminuir o uso de animais de experimentação, como uma prática de uso racional e ética na manipulação de animais de laboratório.

As figuras 12D e 12E, demonstram histologicamente alterações compatíveis com pneumonia intersticial difusa com presença de um padrão linfoplasmocitário. Estes animais foram tratados com um esquema monoterápico de polimixina B ou imipenem, porém, em uma concentração sub-inibitória. O quadro histopatológico é semelhante ao padrão descrito na figura 12C que corresponde ao controle positivo sem tratamento.

Já na figura 12F se observa que a associação de polimixina B e imipenem, em uma dose de cada antibiótico similar ao esquema terapêutico das figuras 12D e 12E, resultou ser efetivo na reversão das alterações histopatológicas de pneumonia intersticial, cujo resultado é comparável com o padrão histopatológico do controle negativo representado na figura 12A.

Muitas dos casos clínicos de infecção por *A. baumannii* produtor de OXA-23 ou OXA-143, individualizados ou associados a surtos de infecção nosocomial, tem tido um desfecho desfavorável pela falta de terapias alternativas, e de fato tem levado ao fechamento de algumas unidades, o que tem sido reportado em diferentes estados brasileiros (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2011; Furtado *et al.*, 2011; Grosso *et al.*, 2011; Rossi, 2011; Martins *et al.*, 2012). Especificamente, com relação a OXA-143, nosso grupo de pesquisa e outros grupos tem alertado sobre este problema emergente em disseminação pelo nosso país (Antonio *et al.*, 2011; Cayô *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 2011; Gionco *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2011; Werneck *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012). Assim, estudos avaliando novos compostos, assim como, a procura de combinações

sinérgicas efetivas contra isolados endêmicos no Brasil, são dignos de investigação.

6- CONCLUSÕES:

O efeito sinérgico decorrente do uso combinado de amicacina, tigeciclina, polimixina B, imipenem, rifampicina ou ampicilina/sulbactam, pode constituir uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções produzidas por cepas de *A. baumannii* MRs, produtoras de oxacilinases, sendo que a combinação amicacina/tigeciclina apresentou atividade sinérgica ($S = \Sigma CIF \leq 0,5$) e parcialmente sinérgica ($PS = \Sigma CIF 0,5-0,75$) contra 4 (50%) cepas produtoras de OXA-143 ou OXA-72, e 2 cepas (25%) produtoras de OXA-23, respectivamente. Por outro lado, a combinação polimixina B/imipenem apresentou atividade *S* e *PS* contra 3 (37,5%) isolados OXA-143, OXA-23 e OXA-72 positivos, e 1 (12,5%) isolado produtor de OXA-58, respectivamente. Já, a combinação amicacina/ampicilina-sulbactam foi *S* contra 2 (25%) *A. baumannii* OXA-143 e OXA-23 positivos, sendo *PS* contra dois (25%) *A. baumannii* OXA-58 e OXA-143/23 positivos. De interesse, foi o efeito *S* da combinação polimixina B/vancomicina, contra 2 cepas (25%) produtoras de OXA-72 ou OXA-23. Por outro lado, a combinação ampicilina-sulbactam/rifampicina apresentou atividade *PS* contra 6 (75%) cepas produtoras das variantes OXA-23, OXA-143, OXA-72 ou OXA-58.

Através da análise histopatológica do tecido pulmonar do modelo murino de infecção sistêmica, foi possível confirmar o efeito sinérgico in vitro da combinação polimixina B x imipenem contra uma cepa de *A. baumannii* MR produtora de OXA-143, representante de um isolado endêmico e, hospitais brasileiros.

Finalmente, nanofragmentos catiônicos de bicamada do lipídeo sintético de DDA tem potencial para consolidar um produto de aplicação clínica uma vez que

apresenta atividade bactericida já na segunda hora de interação, potencializando sinergicamente a tigeciclina contra cepas de *A. baumannii* produtoras de OXA-143 ou OXA-23.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga J, Turano H, Lincopan N. Enhancing Activity of Tigecycline to Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* by using DDA Bicelles: Synergistic Activity and Physico-Chemical Behavior. In: 52st ICAAC Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy,, 2012, San Francisco, CA .
- Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1417-30.
- Ansaldi F, Canepa P, Bassetti M, Zancolli M, Molinari MP, Talamini A, Ginocchio F, Durando P, Mussap M, Orenco G, Viscoli C, Icardi G. Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. *J Hosp Infect*. 2011 Oct;79(2):134-40.
- Antonio CS, Cavina F, Lincopan N, Mamizuka EM. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Characterization of bla-OXA-23-like genes. 1ª Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008, Gramado.
- Antonio, CS, Neves P, Mamizuka EM, Lincopan, N. Disseminação e emergência de genes blaOXA-23, blaOXA-58, blaOXA-72 e sequências de inserção (IS) em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. In: 25º Congresso Brasileiro De Microbiologia, Porto de Galinhas, 2009. Resumo
- Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011Mar;55(3):1322-3.
- Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD, Hippeaux MC, Eveillard M, Dreyfuss D, Branger C. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *J Hosp Infect*. 2010 Dec;76(4):358-60.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Apr;9(2):148-65.
- Bergogne-Bérézin E. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 1997 Feb;6(2):119-27.
- Bertini A, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A. First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jun;50(6):2268-9
- Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Sep;38(1):43-50
- Boo TW, Walsh F, Crowley B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Nov;58(5):1101-2.
- Boyd N, Nailor MD. Combination antibiotic therapy for empiric and definitive treatment of gram-negative infections: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2011 Nov;31(11):1073-84
- Calhoun JH, Murray CK, Manring MM. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Jun;466(6):1356-62.
- Candel FJ, Calvo N, Head J, Sánchez A, Matesanz M, Culebras E, Barrientos A, Picazo J. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a

- renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev Esp Quimioter.* 2010 Jun;23(2):103-8.
- Carmona-Ribeiro AM, Chaimovich H. Salt-induced aggregation and fusion of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate vesicles. *Biophys J.* 1986 Oct;50(4):621-8.
- Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *An Acad Bras Cienc.* 2000;72(1):39-43
- Carvalho AMC, Brito EL, Germoglio HB, Gontijo FPP. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase (Kpc) no Hospital Universitário Lauro Wanderley - Universidade Federal da Paraíba 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009 resumo ID 2123-1.
- Carretto E, Barbarini D, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, Brisse S, Passet V, Farina C; on behalf of the APSI Acinetobacter Study Group. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. *Infect Genet Evol.* 2011 Aug;11(6):1319-1326.
- Cayô, R., Petrolini, F. V. C., Carvalhaes, C. G., Cardoso, J. P., Machado, A. M. O., Gales, A. C. 2011, C2-645, ICAAC 2011, Chicago, IL, USA
- Chiang SR, Chuang YC, Tang HJ, Chen CC, Chen CH, Lee NY, Chou CH, Ko WC. Intratracheal colistin sulfate for BALB/c mice with early pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Care Med.* 2009 Sep;37(9):2590-5.
- Clemente WT, Paião ID, Medeiros M, Braga, ML, Neves FC, Lincopan N. Fatal Outbreak of OXA-143-Producing *Acinetobacter baumannii* in Belo Horizonte, Brazil. In: 51st ICAAC Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy,, 2011, Chicago, IL.
- Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):756-8.
- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):3403-6.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Dec;5(12):939-51.
- Dougherty PF, Yotter DW, Matthews TR. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977 Feb;11(2):225-8.
- Entenza JM, Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Jul;34(1):8.e1-9.
- Fedler KA, Biedenbach DJ, Jones RN. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Dec;56(4):427-36.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Perea EJ. In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinobacter baumannii*. *Chemotherapy.* 2003 May;49(1-2):24-6.
- Ferreira AE, Marchetti DP, De Oliveira LM, Gusatti CS, Fuentefria DB, Corção G. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microb Drug Resist.* 2011 Jun;17(2):221-7.
- Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 May;106(3):368-70.

- Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):692-9.
- Franolić-Kukina I, Bedenić B, Budimir A, Herljević Z, Vraneš J, Higgins PG. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int J Infect Dis*. 2011 Oct;15(10):e706-9.
- Fu Y, Zhou J, Zhou H, Yang Q, Wei Z, Yu Y, Li L. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Apr;65(4):644-50.
- Furtado GH, Cavalcante AC, Medeiros EA, Gales AC, Oliveira VG, Girardelo R. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control*. 2011 Oct;39(8):706-8.
- Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):183-90.
- Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 315–21.
- Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Sep;66(9):2070-4.
- 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). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 May 30.
- Garlantézec R, Bourigault C, Boles JM, Prat G, Baron R, Tonnelier JM, Cosse M, Lefevre M, Jourdain S, Lelay G, Daniel L, Virmaux M, Le Du I, Tande D, Renault A, Lejeune B. Investigation and management of an imipenem-resistant oxa-23 *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Med Mal Infect*. 2011 Aug;41(8):430-6.
- Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Chambers HF, Saag MS. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2010 Editora: Sanford Guide, 2010.
- Gionco B, Silva RC, Gales AC, Venancio EJ, Pelayo JS, Carrara-marroni FE. Emergência de uma nova variante de OXA-143 em um isolado clínico de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Londrina. . 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011 Foz do Iguaçu, ResumID: 1790-2
- Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2010a Mar;35(3):219-26.
- Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010b Dec;54(12):5316-22.
- Greenwood, D; Antimicrobial Chemotherapy. 4ªed. Oxford, Oxford University Press, 2000
- Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jan;66(1):62-5.
- Guelfi KC, Tognim MC, Cardoso CL, Gales AC, Carrara-Marrone FE, Garcia LB. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of meropenem in combination with polymyxin B and gatifloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother*. 2008 Apr;20(2):180-5.

- Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother.* 1983 May;11(5):427-33.
- Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother.* 2005a Jan;55(1):115-8.
- Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005b Aug;49(8):3198-202.
- 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 Dec;53(12):5035-8.
- Hornsey M, Wareham DW. In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3534-7.
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2241-5.
- Jiang W, Liu H, Zhong M, Yang YC, Xiao DW, Huang WF. Study on the Resistant Genes to Carbapenems and Epidemiological Characterization of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Microb Drug Resist.* 2012 Jul 30
- Jones RN. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clin Infect Dis.* 2006 Jan 1;42 Suppl 1:S13-24.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, Mendes C; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis.* 2005a Jun;9(3):216-24.
- Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, Oplustil CP, Koga PC, Arruda AC, Turner PJ, Mendes C. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005b Aug;52(4):317-22.
- Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN, Lee WG, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Dec;68(4):432-8
- Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Kaewdaeng S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Sep;36(3):243-6.
- Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):627-32.
- Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC, Savelkoul PH. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Aug;36(2):114-8.
- Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH, Yong D, Chong Y, Woodford N, Livermore DM; KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Jun;33(6):520-4.
- Levin AS, Barone AA, Penço J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, Manrique EI, Costa SF. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 1999 May;28(5):1008-11.

- Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Jan;21(1):58-62.
- Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouvelekis LS, Petinaki E. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill*. 2012 Mar 15;17(11).
- Lim TP, Tan TY, Lee W, Sasikala S, Tan TT, Hsu LY, Kwa AL. In-vitro activity of polymyxin B, rifampicin, tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *PLoS One*. 2011 Apr 21;6(4):e18485.
- Lin WR, Lu PL, Siu LK, Chen TC, Lin CY, Hung CT, Chen YH. Rapid control of a hospital-wide outbreak caused by extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii*. *Kaohsiung J Med Sci*. 2011 Jun;27(6):207-14.
- Lincopan N, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Sep;52(3):412-8.
- Lincopan N, Espíndola NM, Vaz AJ, da Costa MH, Faquim-Mauro E, Carmona-Ribeiro AM. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. *Vaccine*. 2009 Sep 25;27(42):5760-71
- Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, Levy CE. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis*. 2010 Apr;14(4):e344-7.
- Lorian, Victor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 1 ed. Williams & Wilkins, London 1980.
- Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):641-7.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81.
- Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Louro D; Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, Caniça M. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Aug 10.
- Madigan, M T. Martinko, JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
- Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist*. 2008 Dec;14(4):289-92.
- Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1254-63. Review.
- Marra AR, Pereira CA, Gales AC, Menezes LC, Cal RG, de Souza JM, Edmond MB, Faro C, Wey SB. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):388-90.
- Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1866-71.

- Marqué S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4885-8.
- Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 May;41(5):881-5.
- Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*. 2009 Oct;37(5):474-6.
- Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL; CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2012 Mar;40(2):108-12.
- Medeiros M, Antonio C, Neves P, Mamizuka E, Lincopan N. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Carrying *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-143} Oxacillinase Genes in Southeastern Brazil 2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2010, Florianópolis, ResumolD: 102-2.
- Medeiros M, Paião ID, Clemente WT, Braga ML, Neves FAC, Lincopan N. Fatal Outbreak of OXA-143-Producing *Acinetobacter baumannii*, Belo Horizonte, Brazil. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011 Foz do Iguaçu, ResumolD: 1751-1
- Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo-β-lactamase. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.2, 2006.
- Merkier AK, Catalano M, Ramírez MS, Quiroga C, Orman B, Ratier L, Famiglietti A, Vay C, Di Martino A, Kaufman S, Centrón D. Polyclonal spread of *bla*(OXA-23) and *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2008 Jun 1;2(3):235-40.
- Michalopoulos A, Falagas ME. Colistin and polymyxin B in critical care. *Crit Care Clin*. 2008 Apr;24(2):377-91,
- Mohr JF, Murray BE. Point: Vancomycin is not obsolete for the treatment of infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 15;44(12):1536-42.
- Moland ES, Craft DW, Hong SG, Kim SY, Hachmeister L, Sayed SD, Thomson KS. In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and selection of tigecycline-amikacin synergy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2940-2.
- Moreira, L.B. Princípios para o uso racional de antimicrobianos. *Revista da AMRIGS* 2004;2:73-152.
- Mostachio AK, Van der Heijden I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*. 2009 Nov;58(Pt 11):1522-4.
- 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 May;39(5):396-401.
- Moura JP & Gir E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas. *Acta Paul Enferm* 2007;20(3):351-6.
- Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Sep;14(9):879-82.
- Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol*. 2006 Jul;55(Pt 7):857-60.

- National Committee For Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico. 6th ed. Approved standards NCCLS document M7–A6. Wayne, Pa: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*; 2007.
- Niumsup PR, Boonkerd N, Tansawai U, Tiloklurs M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Mar;62(2):152-4.
- Noskin GA. Tigecycline: a new glycycline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41 Suppl 5:S303-14. Review
- Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of bla OXA genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol*. 2012 Jul;35(3):317-25
- Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):1.
- Oliveira MS, Prado GV, Costa SF, Grinbaum RS, Levin AS. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Jun;61(6):1369-75.
- Oliveira M L, Clímaco E C, Oliveira MG, Darini ALC. Dissemination of oxa carbapenemases genes in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in University Hospital of Juiz de Fora, MG. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso)
- Oliveira S; Fontes LC, SILVA KC, PUSZTAI J, HACHAICH EM, SATO MIZ, LINCOPAN N, Dissemination Of KPSC-2 Producing K. *Pneumoniae Aad OxXA-23 Positive A Baumannii In Urbarn Rivers*, São Paulo,razil. In: 26°Cbm Foz Iguaçu, Brasil 2011
- Oliveira TR, Benatti CR, Lamy MT. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1808(11):2629-37
- Pacheco LF, Carmona-Ribeiro AM. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. *J Colloid Interface Sci*. 2003 Feb 1;258(1):146-54.
- Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachón J. Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Nov;48(11):4479-81.
- Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Sep;56(3):470-80.
- Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest and time-kill assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;63(2):228-32.
- Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek hospital. *Microb Drug Resist*. 2009 Dec;15(4):257-60.
- Peck KR, Kim MJ, Choi JY, Kim HS, Kang CI, Cho YK, Park DW, Lee HJ, Lee MS, Ko KS. In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *J Med Microbiol*. 2012 Mar;61(Pt 3):353-60.
- Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):399-400.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen *Clin. Microbiol. Rev*. 2008 July; 21(3):538–582
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3471-84.

- 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. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Mar;57(3):573-6.
- Petrosillo N, Drapeau CM, Agrafiotis M, Falagas ME. Some current issues in the pharmacokinetics/pharmacodynamics of antimicrobials in intensive care. *Minerva Anesthesiol.* 2010 Jul;76(7):509-24. Review
- Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):202-8.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):24-38. Epub 2009 Aug 31. Review.
- Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Mar;57(3):557-61.
- Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009 May 21;8:18.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440-58, table of contents. Review.
- Rand KH, Houck HJ, Brown P, D Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 March; 37(3): 613–615.
- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis.* 1998 Apr-Jun;4(2):195-209. Review
- Reis AO, Luz DA, Tognim MC, Sader HS, Gales AC. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):1025-7.
- Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptides antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989 Nov;8(11):943-50. Review.
- Ribeiro J, Mendes RE, Domingos R, França E, Silbert S, Jones RN, Sader HS. Microbiological and epidemiological characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Brazilian tertiary hospital: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Chemother.* 2006 Oct;18(5):461-7.
- Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, Spinozzi M, Nastro M, Bombicino K, Radice M, Gutkind G, Vay C, Famiglietti A. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *J Infect Dev Ctries.* 2010 Mar 29;4(3):164-7
- Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011 May;52(9):1138-43.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001 Aug;5(4):200-14.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Mar;32(2):234-58.
- Savov E, Chankova D, Vatcheva R, Dinev N. In vitro investigation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to ampicillin/sulbactam alone and in combination with amikacin. *Int J Antimicrob Agents.* 2002 Nov;20(5):390-2.
- Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother.* 1995 Sep;36(3):585-6.

- Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, Nascimento AJ, Carignano E, Dalla Costa LM. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2010 May;38(4):308-14.
- Sheng WH, Wang JT, Li SY, Lin YC, Cheng A, Chen YC, Chang 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. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Jul;70(3):380-6
- 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 *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4678-83.
- Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jul;14(7):723-7.
- Tan TY, Lim TP, Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL. In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan;55(1):436-8.
- Tatman-Otkun M, Gürçan S, Ozer B, Shokrylanbaran N. Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. *New Microbiol*. 2004 Jan;27(1):21-8.
- Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Pasculle AW, Quinn JP, Wang HN, Doi Y. Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan;55(1):429-32.
- Tillotson GS. Where does novel antibiotics R&D stand among other pharmaceutical products: an industrial perspective? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008 Oct;6(5):551-2.
- Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Mar;27(3):224-8.
- Tong W, Wang R, Chai D, Li Z, Pei F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Nov;28(5):454-6.
- Vieira DB, Pacheco LF, Carmona-Ribeiro AM. Assembly of a model hydrophobic drug into cationic bilayer fragments. *J Colloid Interface Sci*. 2006 Jan 1;293(1):240-7.
- Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J*. 2009 Dec 31;50(6):764-70.
- Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):753-7.
- Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. From Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):4022-8.
- Wareham DW, Bean DC. In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006 Apr 21;5:10
- Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Feb;66(2):452-4.

- Werneck JS, Picão RC, Girardello R, Cayô R, Marguti V, Dalla-Costa L, Gales AC, Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N. Low prevalence of blaOXA-143 in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4494-5
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Aug;40(8):1914-8.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Dec;60(6):1206-15.
- Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Barth AL. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis*. 2010 Jun;14(6):e539-40.
- Zhang JP, Zhu W, Tian SF, Chu YZ, Chen BY. Molecular characteristics and resistant mechanisms of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Shenyang, China. *J Microbiol*. 2010 Oct;48(5):689-94.
- Zhou H, Pi BR, Yang Q, Yu YS, Chen YG, Li LJ, Zheng SS. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAba1 blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. *J Med Microbiol*. 2007 Aug;56(Pt 8):1076-80.

8- ANEXOS

7.1 Carta de aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

7.3 Currículo Lattes

7.4 Histórico escolar