

**Saidy Liceth Vásquez Noguera**

**Avaliação de sinergismo *in vitro* dos aminoglicosídeos em combinação com carbapenêmicos, ceftazidima/avibactam e polimixinas, em isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens* multidroga-resistentes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador (a): Prof. Dr. Lauro Viera Perdigão Neto

Coorientador (a): Dra. Marina Farrel Côrtes

**São Paulo, 2023**

**Saidy Liceth Vásquez Noguera**

**Avaliação de sinergismo *in vitro* dos aminoglicosídeos em combinação com carbapenêmicos, ceftazidima/avibactam e polimixinas, em isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens* multidroga-resistentes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador (a): Prof. Dr. Lauro Viera Perdigão Neto

Coorientador (a): Dra. Marina Farrel Côrtes

**São Paulo, 2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vásquez Noguera, Saily Liceth  
Avaliação de sinergismo in vitro dos aminoglicosídeos em combinação com carbapenênicos, ceftazidima/avibactam e polimixinas, em isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens* multidroga-resistentes / Saily Liceth Vásquez Noguera. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientador: Lauro Vieira Perdigão Neto.  
Coorientadora: Marina Farrel Côrtes.

Descritores: 1.Bactérias gram-negativas 2.Resistência microbiana a medicamentos 3.Aminoglicosídeos 4.Sinergismo farmacológico 5.Genoma

USP/FM/DBD-285/23

Responsável: Erialva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*A Deus ...*

*Aos meus pais, Néstor e Miriam,  
cuja dedicação e apoio foram  
fundamentais para trilhar esse  
caminho acadêmico longe de casa ...*

## AGRADECIMENTOS

- \* Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha sincera gratidão à Dra. Silvia Costa, que desde o início me acolheu de braços abertos, mesmo sem me conhecer previamente. Sua empatia e generosidade foram evidentes desde o início, proporcionando-me um ambiente de trabalho estimulante e enriquecedor. Sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de aprender com você e por toda a confiança depositada em mim.
- \* Ao meu orientador, professor Lauro Perdigão Neto, só tenho a expressar minha profunda gratidão pela sua orientação excepcional ao longo de toda essa jornada acadêmica. Sua sabedoria, paciência e gentileza foram fundamentais para o meu crescimento como pessoa e pesquisador.
- \* À minha coorientadora, Dra. Marina Farrel Côrtes, cujas contribuições foram de valor inestimável para a conclusão desta tese. Agradeço pela sua generosidade em compartilhar seu conhecimento e pela amizade ao longo desses anos.
- \* Aos meus colegas de trabalho e amigos do LIM-49, que são um presente inestimável que o Brasil me deu, de maneira especial a Juliana, por ser minha guia nos experimentos de *Time-Kill*, à Dra. Inneke, Camila, Ana Paula Barboza, Nazareno, Joyce, Beatriz, Sania, Elenice, Danilo, Leticia - expresso minha profunda gratidão pela parceria e apoio ao longo desses anos. Agradeço por estarmos unidos nessa jornada, superando desafios e compartilhando conquistas.
- \* Às minhas amigas Ana Paula M. e Alessandra, sou imensamente grata pela ajuda incondicional que sempre recebi de vocês. Nossa parceria tem sido excepcional e sou verdadeiramente privilegiada por tê-las ao meu lado.
- \* À minha amiga, Evelyn que me acolheu desde o momento que cheguei e, mesmo à distância, continua me apoiando.
- \* À equipe do GCIH do Hospital das Clínicas, de maneira especial a professora Anna Sara Levin, Bruno, Maura e Sueli cujo apoio foi fundamental para tornar possível esta tese. Sem o seu amparo e colaboração, essa conquista não teria sido alcançada.
- \* À minha amiga, Caroline que tem sido uma companheira incansável nas jornadas longas durante a pandemia, e pelos ensinamentos de português nos meus primeiros meses no Brasil.
- \* À Luizinha e Caroline da pós graduação, por sempre se mostrar com empatia e carinho ao me fornecer ajuda em todos os processos da minha jornada acadêmica.

- \* Aos membros da banca de qualificação (Dr. Ícaro Boszczowski, Dra. Ana Paula Cury e Dra. Silviane Praciano) expressei minha profunda gratidão pelos valiosos ajustes e sugestões feitas para aprimorar esta tese.
- \* Aos meus professores da PUC-Ecuador, Eduardo e Andrés, por ter-me introduzido ao maravilhoso mundo da pesquisa, e aos meus amigos Pamela, Andrea S, Christian, Sebastian, Andrea M, Daniela, pelas palavras de encorajamento e momentos de descontração que foram essenciais para manter meu equilíbrio emocional.
- \* À toda minha família, meus pais, irmãos (Danilo, Marly e Shary) e sobrinhos (Camila, Danilo e Mateo) agradeço pelo carinho e inspiração que sempre encontrei em vocês. Não há palavras suficientes para expressar o quanto sou grata pelo imenso esforço que fizeram por mim ao longo da minha jornada. Ao David, por sempre estar ao meu lado, tanto nos momentos de felicidade como nos momentos mais desafiadores. Seu apoio e seu constante incentivo têm sido essenciais para o meu crescimento.
- \* Esta tese é uma testemunha do amor e apoio incansáveis que recebi de todos vocês.

" Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

*Madre Teresa de Calcutá*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica em Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana (LIM49) da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro ao projeto com recursos próprios do laboratório e auxílio financeiro ao aluno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Bibliotecas e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2016.

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

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aminoglicosídeos (AGs) .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Amicacina .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Gentamicina .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Resistência aos aminoglicosídeos .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos .....</b>	<b>8</b>
1.5.1 Mutações ou modificações do Sítio Alvo (Ribossomo).....	8
1.5.2 Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs).....	9
1.5.3 Modificação da Membrana Celular.....	10
<b>1.6 Combinação com outros agentes antibacterianos.....</b>	<b>10</b>
1.6.1 Meropenem.....	10
1.6.2 Colistina .....	11
1.6.3 Ceftazidima/avibactam (CZA) .....	12
<b>1.7 Eficácia dos estudos de sinergismo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>1.8 Métodos de sinergismo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>16</b>
1.8.1 <i>Time-kill</i> (TK) .....	16
1.8.2 <i>Checkerboard</i> (Tabuleiro).....	17
1.8.3 Teste epsilométrico (E-test) .....	17
1.8.4 Disco aproximação (DA) .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Objetivo geral:.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Objetivos específicos:.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Local do estudo.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Desenho do estudo.....</b>	<b>20</b>

<b>4.3</b>	<b>Microrganismos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4</b>	<b>Cepas de controle de qualidade .....</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>Antimicrobianos usados no estudo .....</b>	<b>23</b>
<b>4.6</b>	<b>Métodos para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.7</b>	<b>Métodos de avaliação de sinergismo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>24</b>
	4.7.1 Método epsilométrico (E-test) Ângulo de 90°.....	24
	4.7.2 Método de Disco aproximação.....	25
	4.7.3 Método de <i>Time-Kill</i> (Curva de morte).....	26
<b>4.8</b>	<b>Tipos de erros de interpretação e concordância entre os testes.....</b>	<b>27</b>
<b>4.9</b>	<b>Sequenciamento do Genoma Completo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.10</b>	<b>Análises dos resultados.....</b>	<b>30</b>
<b>4.11</b>	<b>Aspectos Éticos .....</b>	<b>31</b>
<b>4.12</b>	<b>Fluxograma de trabalho .....</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Resultados de sinergismo .....</b>	<b>35</b>
	5.2.1 Determinação de sinergismo pelo método Epsilométrico (E-test).....	35
	5.2.1.1 Variação na redução da concentração inibitória mínima da amicacina quando combinada com os outros antibióticos.....	42
	5.2.2 Determinação de sinergismo pelo método de disco aproximação .....	43
<b>5.3</b>	<b>Análise de concordância entre métodos de sinergismo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4</b>	<b>Sinergismo <i>in vitro</i> e perfil de sensibilidade dos isolados .....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização dos principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos.....</b>	<b>53</b>
<b>5.6</b>	<b>Relação entre os genes de resistência com o perfil de sensibilidade e o efeito de sinergismo antimicrobiano .....</b>	<b>63</b>
	5.6.1 Genes de resistência e o perfil de sensibilidade .....	63
	5.6.2 Genes de resistência associados ao efeito de sinergismo.....	67
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
	<b>Anexo A – Aprovação do Comite de Ética .....</b>	<b>93</b>
	<b>Anexo B – Produção científica .....</b>	<b>94</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Taxas de resistência dos bacilos gram-negativos à gentamicina e amicacina .	7
Quadro 2. Informações dos 72 isolados selecionados para o estudo.....	21
Quadro 3. Tipos de erros de interpretação nos testes de sinergismo <i>in vitro</i> .....	28
Quadro 4. Mecanismos de resistência relacionados a resistências aos aminoglicosídeo.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação da sensibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo, fita de gradiente e disco difusão para os antibióticos testados.....	34
Tabela 2. Resultado do teste de sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> .....	37
Tabela 3. Resultado do teste de sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de <i>A. baumannii</i> .....	39
Tabela 4. Resultado do sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de <i>S. marcescens</i> .....	40
Tabela 5. Tabela de variação na redução da CIM da amicacina em combinação com diferentes antibióticos.....	43
Tabela 6. Análise de concordância entre o disco aproximação e ensaio E-test de acordo com as combinações antimicrobianas testadas.....	47
Tabela 7. Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas de acordo com os métodos de disco aproximação e Epsilométrico.....	49
Tabela 8. Associação entre o perfil de sensibilidade e a presença do sinergismo antimicrobiano em todas as combinações testadas.....	50
Tabela 9. Relação entre a interação de amicacina com os outros antibióticos e o perfil de sensibilidade em <i>K. pneumoniae</i> . .....	51
Tabela 10. Relação entre a interação de amicacina com os outros antibióticos e o perfil de sensibilidade em <i>A. baumannii</i> . .....	52
Tabela 11. Relação entre o resultado da interação entre amicacina com meropenem com o perfil de sensibilidade em <i>S. marcescens</i> . .....	52
Tabela 12. Genes de resistência aos aminoglicosídeos presentes no cromossomo bacteriano ou plasmídeos nos isolados.....	59
Tabela 13. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> .....	68
Tabela 14. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de <i>A. baumannii</i> .....	74
Tabela 15. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de <i>S. marcescens</i> . .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos em pacientes hospitalizados em UTI adulto - Brasil, 2020 .....	2
Figura 2.	Estrutura química dos aminoglicosídeos a través da linha do tempo. ....	3
Figura 3.	Mecanismo de captação dos aminoglicosídeos (AG) pelas células bacterianas Gram-negativas e inibição da síntese proteica. ....	5
Figura 4.	Representação gráfica dos principais mecanismos de resistência aos AGs.....	8
Figura 5.	Imagem ilustrativa da interação antimicrobiana ao nível celular. ....	14
Figura 6.	Diagrama da montagem da fita para o método de sinergismo E-test. ....	25
Figura 7.	Diagrama do ensaio para o método de sinergismo de disco aproximação.....	26
Figura 8.	Cinética da curva de morte que demonstra o crescimento dos microrganismos. ....	27
Figura 9.	Fluxograma representando as atividades desenvolvidas durante o estudo.....	32
Figura 10.	Ensaio do teste elipsométrico nas combinações antimicrobianas nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> . ....	41
Figura 11.	Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) da amicacina combinada com colistina, meropenem e ceftazidima-avibactam .....	42
Figura 12.	Frequência de sinergismo antibiótico pelo método de disco aproximação nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> .....	44
Figura 13.	Frequência de sinergismo antibiótico pelo método de disco aproximação nos isolados de <i>A. baumannii</i> . ....	44
Figura 14.	Frequência de sinergismo pelo método de disco aproximação nos isolados de <i>S. marcescens</i> .....	45
Figura 15.	Resultados representativos dos efeitos encontrados no método de disco aproximação.	46
Figura 16.	Representação da dinâmica de crescimento em função do tempo das diferentes combinações de antimicrobianos .....	48
Figura 17.	. Representação dos genes de resistência e suas mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em <i>K. pneumoniae</i> . ....	55
Figura 18.	Representação dos genes de resistência e as mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em <i>A. baumannii</i> .....	56

Figura 19. Representação dos genes de resistência e as mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em <i>S. marcescens</i> . .....	57
Figura 20. Principais plasmídeos associados a resistência nos aminoglicosídeos....	62
Figura 21. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos 40 isolados de <i>K. pneumoniae</i> . .....	64
Figura 22. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados de <i>A. baumannii</i> . .....	65
Figura 23. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados de <i>S. marcescens</i> . .....	66
Figura 24. Resultado do alinhamento múltiplo de sequencias.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μL	Microlitro
AK	Amicacina
<i>bla</i>	Gene codificador de β-lactamases
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COL	Colistina
CVE	Centro de Vigilancia Epidemiológica
CZA	Ceftazidima/avibactam
E-test	<i>Epsilometer test</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FICI	Índice da concentração inibitória fracionada
GEN	Gentamicina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
Log	Logaritmo
MDR	Multidroga-resistente
MEM	Meropenem
MHA	Mueller Hinton Ágar
MHCA	Mueller Hinton Ágar cátion ajustado
mL	Mililitro
mm	Milímetro



NDM	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase
OXA	Oxacilinase
PCR	Polimerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
ST	Sequence typing
SGC	Sequenciamento do genoma completo
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## RESUMO

Vásconez Noguera SL. *Avaliação de sinergismo in vitro dos aminoglicosídeos em combinação com carbapenêmicos, ceftazidima/avibactam e polimixinas, em isolados de K. pneumoniae, A. baumannii e S. marcescens multidroga-resistentes* [Tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Nos últimos anos e devido à pandemia de COVID-19, um número crescente de isolados de bactérias gram-negativas tem apresentado resistência aos antibióticos. O último relatório da OMS destaca esses microrganismos dentro da categoria crítica, o que representa um desafio importante no tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde, pela escassez de novas drogas terapêuticas. Estudos recentes demonstram que os tratamentos contra organismos multirresistentes possam ser mais eficazes em terapia combinada de antibióticos do que em monoterapia. **Objetivo:** Avaliar o sinergismo *in vitro* dos aminoglicosídeos com outros antimicrobianos em bactérias gram-negativas multirresistentes de linhagens distintas e com mecanismos de resistência variados. **Materiais e Métodos:** Foram estudados 72 gram-negativos multirresistentes: 40 *Klebsiella pneumoniae*, 20 *Acinetobacter baumannii* e 12 *Serratia marcescens*. Os microrganismos foram isolados de sangue, urina, tecido nervoso e aspirado traqueal e foram identificados no sistema automatizado Vitek-2, por PCR e por sequenciamento de genoma completo. Os métodos de disco aproximação e epsilométrico (E-test) foram utilizados para avaliar o sinergismo *in vitro* entre os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) com colistina, meropenem e ceftazidima/avibactam. **Resultados:** Em 72,5% (29/40) dos isolados de *K. pneumoniae* se evidenciou efeito sinérgico na combinação entre amicacina com colistina. Nos isolados de *A. baumannii* foi observado maior efeito sinérgico em 55% (11/20) na combinação entre amicacina com ceftazidima/avibactam. Nos isolados de *S. marcescens* foi observado efeito sinérgico em 75,0% (9/12) na combinação de amicacina com meropenem. Entretanto, em 17% (2/12) das combinações de amicacina com colistina e 25% (3/12) entre gentamicina com colistina se evidenciou efeito de antagonismo. Houve concordâncias muito boa e boa nas combinações avaliadas de amicacina com colistina e com ceftazidima/avibactam, e amicacina com meropenem, respectivamente. Nos testes de associação entre o perfil de sensibilidade e o efeito de sinergismo se obteve associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com cada combinação avaliada. Os isolados de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* foram frequentemente carreadores de genes de resistência aos

carbapenêmicos, como *bla*<sub>KPC-2</sub> (86%), *bla*<sub>OXA-23</sub> (80%), respectivamente, e outros mecanismos, como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (98%). A avaliação entre os genes de resistência aos aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos mostraram associação com níveis altos da concentração inibitória mínima (CIM) nos aminoglicosídeos. Além disso, a presença de algumas EMAs combinados com  $\beta$ -lactamases foram uma causa significativa da perda de sinergismo na atividade *in vitro*.

**Conclusão:** Em nosso estudo, os aminoglicosídeos demonstraram maior efeito sinérgico combinado com colistina e ceftazidima/avibactam, o que suscita a possibilidade de ser um esquema a ser estudado clinicamente como uma alternativa à monoterapia em infecções por bactérias multirresistentes. Os métodos de sinergismo avaliados utilizando E-test e disco aproximação apresentaram ótimo desempenho e concordância, tornando-se os métodos mais eficazes e úteis na hora de analisar associação entre os antibióticos no laboratório de microbiologia convencional.

**Descritores:** Bactérias gram-negativas; Resistência microbiana a medicamentos; Aminoglicosídeos; Sinergismo farmacológico; Genoma.

## ABSTRACT

Vásconez Noguera SL. *In vitro* evaluation of synergism of aminoglycosides in combination with carbapenem, ceftazidime/avibactam and polymyxin drugs in multidrug-resistant *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *S. marcescens* isolates [Thesis]. São Paulo, "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** In recent years, and due to the COVID-19 pandemic, an increasing number of Gram-negative bacterial isolates have been found to exhibit antibiotic resistance. The latest report from the World Health Organization (WHO) highlights these microorganisms as part of the critical category, which poses a significant challenge in the treatment of healthcare-associated infections, given the scarcity of new therapeutic drugs. Recent studies demonstrate that treatments against multidrug-resistant organisms may be more effective through combination antibiotic therapy rather than monotherapy.

**Objective:** To evaluate the *in vitro* synergistic effects of aminoglycosides in combination with other antimicrobials against multidrug-resistant gram-negative bacteria from diverse lineages and with various resistance mechanisms. **Materials and Methods:** A total of 72 multidrug-resistant Gram-negative bacteria were included: 40 *Klebsiella pneumoniae*, 20 *Acinetobacter baumannii*, and 12 *Serratia marcescens*. The microorganisms were isolated from blood, urine, nervous tissue, and tracheal aspirates and were identified using the automated Vitek-2 system, PCR, and whole-genome sequencing. Disk approximation and E-test methods were employed to assess the *in vitro* synergy between aminoglycosides (amikacin and gentamicin) and colistin, meropenem, and ceftazidime/avibactam. **Results:** A synergistic effect was observed in 72.5% (29/40) of *K. pneumoniae* isolates when combining amikacin with colistin. In *A. baumannii* isolates, a higher synergistic effect was observed in 55% (11/20) with the combination of amikacin and ceftazidime/avibactam. *S. marcescens* isolates exhibited a greater synergistic effect in 75.0% (9/12) with the combination of amikacin and meropenem. However, in 17% (2/12) of the amikacin-colistin combinations and 25% (3/12) of the gentamicin-colistin combinations, an antagonistic effect was observed. There were very good and good agreements in the evaluated combinations of amikacin with colistin and with ceftazidime/avibactam, and amikacin with meropenem, respectively. Significant statistical associations ( $p < 0,05$ ) were found between the sensitivity profile and the synergistic effect for each combination evaluated. *K. pneumoniae* and *A. baumannii* isolates frequently harbored carbapenem resistance genes, such as *blaKPC-2* (86%) and

*bla*OXA-23 (80%), respectively, along with other mechanisms like aminoglycoside-modifying enzymes (98%). Evaluation of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance genes revealed an association with high minimum inhibitory concentration (MIC) levels in aminoglycosides. Furthermore, the presence of certain AMEs combined with  $\beta$ -lactamases was a significant cause of synergy loss in *in vitro* activity. **Conclusion:** In our study, aminoglycosides demonstrated a greater synergistic effect with colistin and ceftazidime/avibactam, suggesting they could be considered as an alternative to monotherapy for infections caused by multidrug-resistant bacteria. The synergy evaluation methods using E-test and disk approximation showed excellent performance and agreement, making them the most effective and useful methods for analyzing antibiotic associations in conventional microbiology laboratories.

**Descriptors:** Gram-negative bacteria, Drug resistance, microbial; Aminoglycosides; Drug synergism; Genome.

## 1. INTRODUÇÃO

Na atual crise antibiótica, as bactérias Gram-negativas multirresistentes representam a maior ameaça pelo alto índice de morbi-mortalidade: entre 30 a 70% (1) (2). O último relatório da Organização Mundial da Saúde destaca que os microrganismos gram-negativos estão dentro da categoria crítica: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias espécies da ordem Enterobacterales incluindo *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Serratia marcescens* e *Proteus* spp. (3). Portanto, isso representa um desafio importante no tratamento dos patógenos, principalmente pela escassez de novas drogas terapêuticas. Alguns estudos têm demonstrado que os tratamentos contra microrganismos multirresistentes talvez sejam mais eficazes em terapia combinada de antibióticos do que em monoterapia, com melhores desfechos clínicos (3), (4).

A distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos do Brasil revela um cenário preocupante de resistência bacteriana, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) observou-se um aumento significativo na proporção de microrganismos resistentes em relação a diferentes classes de antimicrobianos. Em *A. baumannii*, foi observada uma taxa de resistência aos carbapenêmicos de 84,3%. Para *Klebsiella pneumoniae*, a resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração foi de 71,7%. Em *S. marcescens*, a resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração foi de 49,8%, enquanto outras enterobactérias apresentaram uma taxa de resistência de 54,9% para as mesmas classes de antimicrobianos (5) (Figura 1). Embora existam poucos dados detalhados sobre a prevalência de *S. marcescens* como um problema de saúde pública no Brasil, a propagação de cepas multirresistentes é preocupante, pois o tratamento de infecções causadas por esta bactéria se tornou desafiador (6). Esse microrganismo é um agente importante na infecção nosocomial oportunista apresentando resistência inerente a diversos grupos de antimicrobianos, incluindo polimixinas.

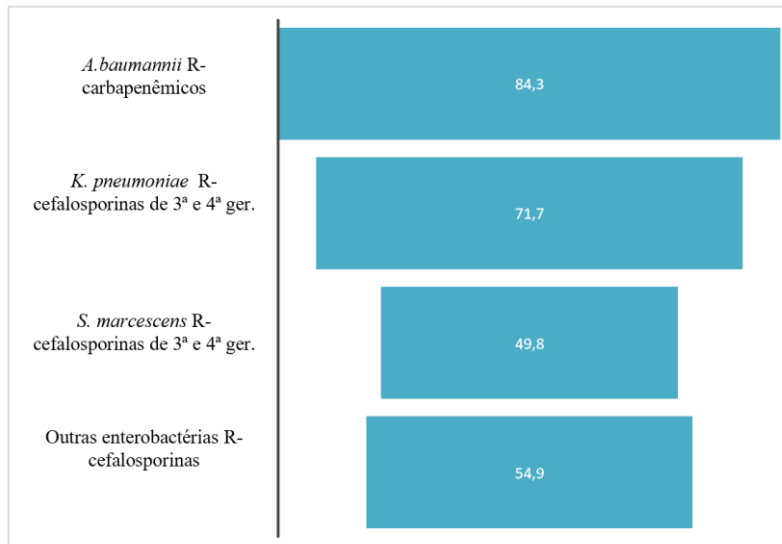


Figura 1. Distribuição dos fenótipos de resistência entre os bacilos Gram-negativos mais frequentes notificados como agentes etiológicos em pacientes hospitalizados em UTI adulto - Brasil, 2020

Além disso, informações recentes do Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo (CVE) trazem dados alarmantes sobre resistência a carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *Enterobacter* spp. (7). Esses elementos reforçam a necessidade urgente de estratégias para o controle da resistência bacteriana e o desenvolvimento de novas terapias para enfrentar esses patógenos multirresistentes.

O reposicionamento de drogas antigas (*repurposing* em inglês), tem se mostrado uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. Essa abordagem envolve o uso de compostos já aprovados ou em desenvolvimento clínico para outras indicações terapêuticas, como a combinação de diferentes classes de antibióticos para melhorar a eficácia do tratamento (8). Vários estudos propõem a reutilização de drogas antigas e a identificação de novos alvos terapêuticos como uma alternativa mais rápida e econômica para combater a resistência, destacando a importância de continuar investindo em pesquisa e desenvolvimento nessa área (9), (10).

## 1.1 Aminoglicosídeos (AGs)

Os aminoglicosídeos foram descobertos na década de 1940 e originalmente isolados dos actinomicetos (11). Eles possuem propriedades farmacocinéticas bem definidas com um amplo espectro de atividade contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo aqueles que são multirresistentes (11), (12). Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos são compostos de substâncias hidrofílicas formadas por dois ou mais amino-açúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol. Eles são classificados de acordo com suas propriedades químicas, divididos em alguns grupos: 2-desoxiestreptamina (DOS) 4,6-dissubstituído, DOS 4,5-dissubstituído, DOS monosubstituído e sem anel DOS (como a estreptomicina) (13) (Figura 2).

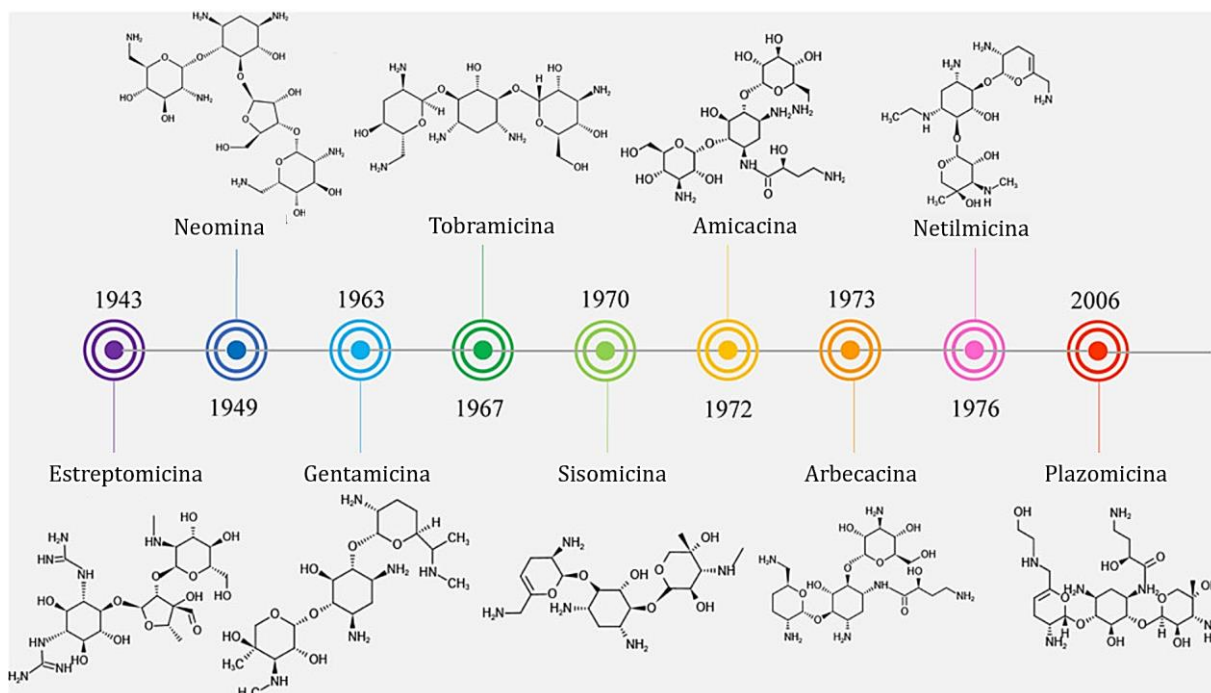


Figura 2. Estrutura química dos aminoglicosídeos a través da linha do tempo. Adaptada de Wachino e Arakawa(13), 2012 e Nuoyan Wang, 2022.

Os aminoglicosídeos apresentam algumas particularidades em sua atividade antibacteriana. A capacidade bactericida desses antibióticos está diretamente relacionada à sua concentração máxima, ou seja, quanto maior a concentração, maior será o efeito bactericida. Além disso, outra característica dos aminoglicosídeos é o efeito pós-antibiótico (PAE), que consiste na supressão do recrescimento bacteriano por algumas



horas após a concentração do antibiótico cair abaixo da concentração inibitória mínima (CIM). Nesse sentido, a obtenção de alta concentração de pico também contribui para o PAE (14), (15).

## 1.2 Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos

O mecanismo primário de ação dos aminoglicosídeos é a inibição de etapas-chave na síntese proteica bacteriana. Os aminoglicosídeos são únicos entre outros inibidores da síntese proteica por serem bactericidas. Todas as outras classes de antibióticos que inibem a síntese proteica, incluindo cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina, macrolídeos, pleuromutilinas e oxazolidinonas, são bacteriostáticas (16). A atividade bactericida dos aminoglicosídeos é devida, em parte, ao seu método de entrada na célula bacteriana, que é descrito com mais detalhe na Figura 3. Além disso, os aminoglicosídeos geralmente produzem um efeito pós-antibiótico prolongado. A combinação única do mecanismo de entrada dos aminoglicosídeos e inibição da síntese proteica bacteriana leva à morte celular bacteriana dependente da concentração.

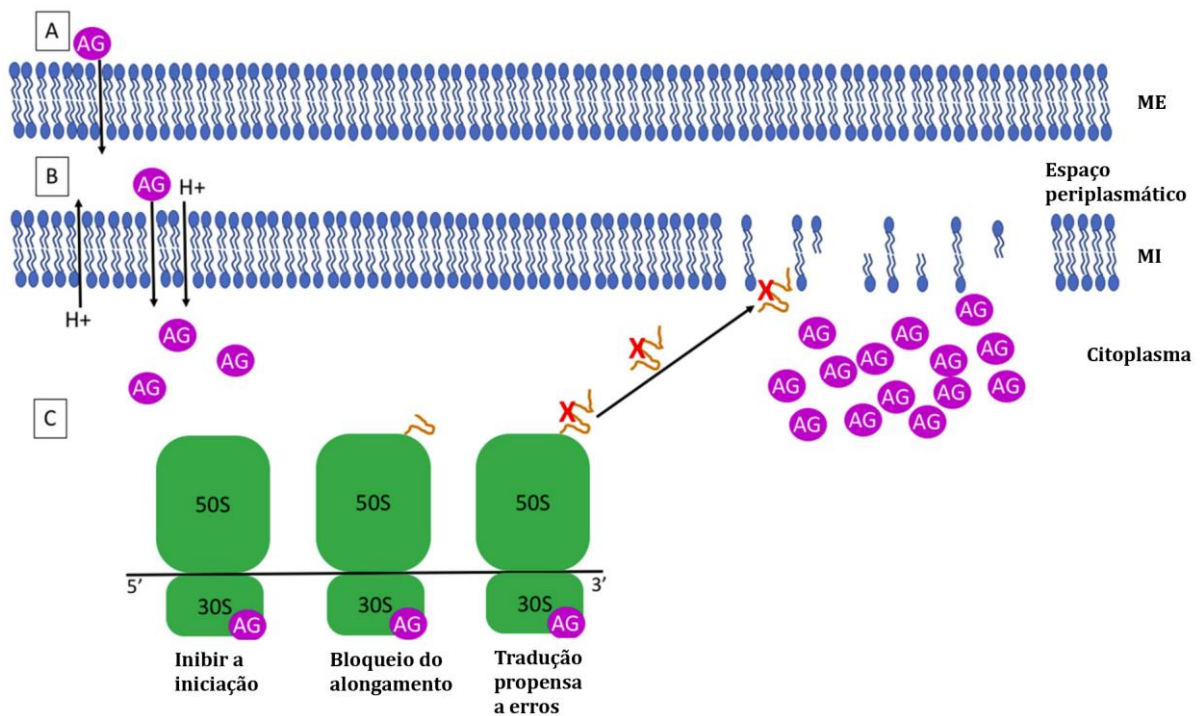


Figura 3. Mecanismo de captação dos aminoglicosídeos (AG) pelas células bacterianas Gram-negativas e inibição da síntese proteica. **A)** Os AGs carregados positivamente entram na célula bacteriana por meio de ligações eletrostáticas com componentes carregados negativamente da membrana externa, permitindo que eles acessem o espaço periplasmático. **B)** Um pequeno número de AGs atravessa a membrana interna usando energia e depende do potencial de prótons, alcançando o citoplasma da célula bacteriana. **C)** Dentro do citoplasma, os AGs se ligam ao RNA ribossômico 16S da subunidade 30S, inibindo a tradução e induzindo traduções com erros. Proteínas mal traduzidas podem danificar a membrana interna, facilitando a entrada dos AGs no citoplasma. Adaptada de Serio et al., 2018.

Até o momento os aminoglicosídeos mais utilizados são amicacina, gentamicina, neomicina, estreptomicina, canamicina, paromicina e tobramicina aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para uso clínico (17), (18). A plazomicina é o mais novo medicamento parenteral aprovado pela FDA em 2018, e recentemente pela ANVISA em 2021, para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário e pielonefrite causadas por enterobactérias multirresistentes, incluindo bactérias produtoras de Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e carbapenemases (19). No entanto, esse fármaco ainda não está amplamente disponível para o tratamento de bactérias MDR.

Embora não sejam de primeira linha em muitos cenários clínicos, os aminoglicosídeos continuam sendo uma classe importante de agentes com excelente atividade bactericida quando os organismos de interesse são resistentes a outras classes, especialmente aos  $\beta$ -lactâmicos e as fluoroquinolonas (12), (20). Alguns estudos questionam se os esquemas antimicrobianos com aminoglicosídeos são uma estratégia que possa reduzir significativamente as doses usadas no tratamento bem como a redução da toxicidade de outras drogas empregadas para a terapia, como por exemplo, as polimixinas (21).

Nesse ponto de vista, amicacina e gentamicina são os aminoglicosídeos amplamente disponíveis que apresentam atividade sobre o maior número de enterobactérias (22). Com o aumento da ocorrência de infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes, especialmente bactérias Gram-negativas, o interesse nos aminoglicosídeos para uso clínico foi reavivado e levou a maiores esforços de pesquisa na ciência (23), (24).

### **1.3 Amicacina**

A amicacina representa a terceira geração dos aminoglicosídeos, sendo um derivado semissintético de álcool cíclico substituído na posição nitrogenada, derivada da kanamicina (Figura 2). É uma droga muito ativa contra a maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo cepas resistentes a gentamicina e tobramicina. A amicacina possui características de baixa resistência aos medicamentos e alta concentração plasmática, o que a torna potencialmente aplicável na prática clínica (25). Altas taxas de resposta foram relatadas com o uso de amicacina combinada com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em pacientes imunocomprometidos ou granulocitopênicos. Apresenta alto efeito de sinergismo *in vitro* contra organismos sensíveis e resistentes aos aminoglicosídeos quando usada em combinação com as novas acilureidopenicilinas e cefalosporinas de terceira geração. Além disso, a amicacina tem a vantagem de ser o aminoglicosídeo menos inativado pelas penicilinas semissintéticas (26).

### **1.3 Gentamicina**

A gentamicina é um antibiótico conhecido como um importante agente terapêutico em infecções adquiridas em ambiente hospitalar e na comunidade. É o aminoglicosídeo de primeira escolha, devido à sua eficácia comprovada contra a maioria dos aeróbios Gram-negativos resistentes, além de possuir ampla experiência de uso (27). Atualmente, embora esses antibióticos possam ser usados como monoterapia no tratamento de infecções do trato urinário, eles são usados principalmente pelo possível sinergismo que podem apresentar quando são combinados com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em patógenos Gram-negativos multirresistentes, como *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (28), (29).

### **1.4 Resistência aos aminoglicosídeos**

As limitações dos aminoglicosídeos incluem a disseminação mundial de mecanismos de resistência, além dos efeitos adversos bem descritos, incluindo ototoxicidade e nefrotoxicidade (30), (31). Infelizmente, semelhante a vários outros

antibióticos, o uso indevido e excessivo de aminoglicosídeos tem feito com que numerosas bactérias apresentem resistência (32), (33).

Um estudo recente sobre vigilância da resistência bacteriana em 52 hospitais da China reportou que as taxas de resistência aos antibióticos gentamicina e amicacina foram relativamente altas para ambos os antibióticos em *K. pneumoniae*, enquanto *E. coli* apresenta resistência alta apenas à gentamicina e baixa à amicacina. Entre os bacilos gram-negativos não fermentadores, *P. aeruginosa* demonstrou ser frequentemente sensível a gentamicina e amicacina, enquanto *Acinetobacter* apresentou alta resistência aos dois tipos de aminoglicosídeos como mencionados no Quadro 1 (34).

Quadro 1. Taxas de resistência dos bacilos gram-negativos à gentamicina e amicacina

Gênero	Microrganismo	Resistencia a gentamicina	Resistencia a amicacina
		(%)	(%)
<b>Enterobacterales spp.</b>	<i>E. coli</i>	37.4	2.7
	<i>Klebsiella</i>	28.9	15.7
<b>Bacilos Gram negativos não fermentadores</b>	<i>P. aeruginosa</i>	8.3	4.5
	<i>Acinetobacter</i>	65.3	50.7

A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos ocorre por diversos mecanismos, como a inativação dos AGs pelas enzimas conhecidas como EMAs. Além disso, a resistência pode ser alcançada por mutações do alvo do ribossomo e por modificações do ribossomo através de enzimas metiltransferases. A barreira intrínseca da parede celular bacteriana também pode impedir a entrada dos AGs na célula, através de modificações lipídicas adquiridas que repelem os AGs. Outro mecanismo ocorre quando as concentrações intracelulares dos AGs podem permanecer baixas devido à expulsão ativa pelas bombas de efluxo (35) (Figura 4).

## 1.5 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

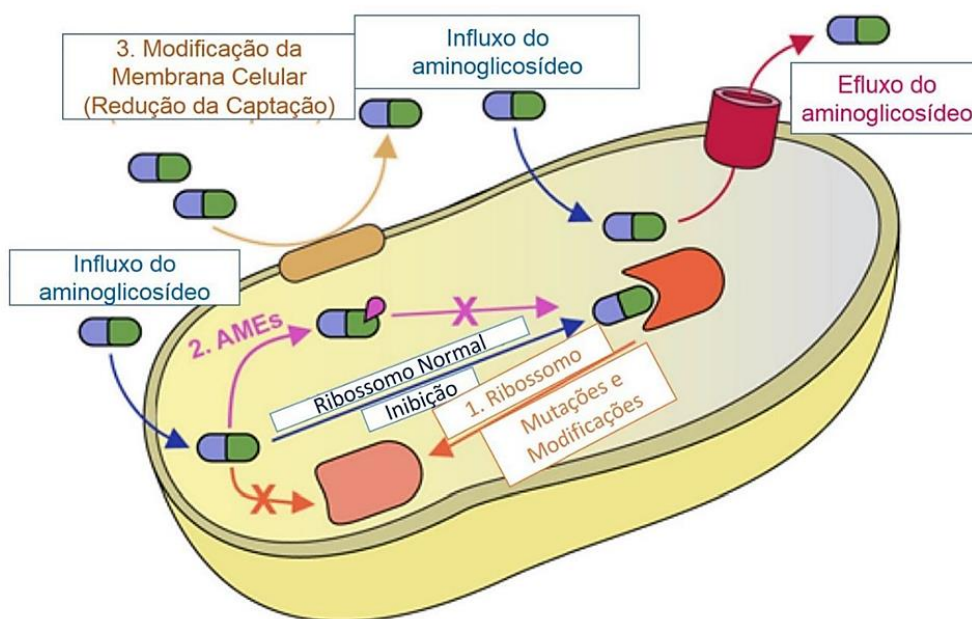


Figura 3. Representação gráfica dos principais mecanismos de resistência aos AGs.  
Adaptada de Garneau-Tsodikiva e Labby, 2016

### 1.5.1 Mutações ou modificações do Sítio Alvo (Ribossomo)

Mutações ribossômicas, podem levar a mudanças na estrutura dos ribossomos, o que pode afetar a ligação dos AGs ao ribossomo e a precisão da tradução de proteínas. Essas mutações ribossômicas podem ocorrer em vários locais dentro do ribossomo, incluindo o sítio A, o sítio P e o centro de decodificação, podendo conferir níveis variados de resistência aos AGs. A modificação do sítio de ligação alvo pode ser consequência de mutação ou modificação enzimática. Nos casos dos AGs contendo 2-DOS, as mudanças normalmente afetam o 16S rRNA presente no sítio A de decodificação de códons da subunidade ribossomal 30S. Entretanto, mutações diretas no sítio A altamente conservado são raras, visto que a maioria dessas mutações é letal (35). As enzimas do tipo metiltransferase ribossomal A (RmtA) e a RmtD são enzimas que realizam a metilação do 16S rRNA, que diminui a afinidade da ligação do aminoglicosídeo ao seu local de ação (36). Por tanto se destaca a importância de entender os mecanismos de resistência aos AGs para desenvolver novas estratégias para combater bactérias resistentes a antibióticos (37).

### 1.5.2 Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs)

Ao contrário das  $\beta$ -lactamases, as enzimas que concedem resistência aos aminoglicosídeos não o fazem por hidrólise, mas sim por transformar a estrutura química do antibiótico, impedindo que este se ligue ao sítio alvo (35). Essa modificação enzimática é o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, que é mediada por três classes de enzimas, as acetiltransferases (AACs), as nucleotidiltransferases (ANTs) e as fosfotransferases (APHs) (38). As EMAs do tipo AACs acetilam o grupo amino de AGs e são divididos em quatro subtipos, enquanto APHs transferem um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila de AGAs e têm sete subtipos. ANTs transferem o grupo adenosina monofosfato (AMP) no ATP para o grupo hidroxila de AGs e têm cinco subtipos. Os genes que codificam as EMAs são frequentemente transportados em plasmídeos, o que pode promover a disseminação da resistência entre as bactérias. As cepas clinicamente isoladas resistentes a aminoglicosídeos frequentemente possuem múltiplos genes EMAs. Os três tipos de EMAs compreendem muitos subtipos, que serão detalhadas:

- As Acetiltransferases (AACs) são enzimas que modificam a estrutura de aminoglicosídeos, adicionando um grupo acetila ao grupo amino (-NH<sub>2</sub>) presente em sua composição. Essas enzimas fazem parte da superfamília N-acetiltransferase (GNAT) e são relacionadas ao GCN5. Existem quatro subtipos de AAC, identificados de acordo com a localização da acetilação: AAC (1), (2'), (3) e (6'). A enzima AAC (6') é a mais comum e amplamente distribuída em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Seus genes são encontrados em plasmídeos e cromossomos, e fazem parte de elementos genéticos móveis (23).

- As fosfotransferases (APH) transferem um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila (-OH) na molécula de aminoglicosídeo e compreendem sete subtipos: APH (2''), (3'), (3''), (4), (6), (7'') e (9). O gene *aph (6) -Id* foi descoberto pela primeira vez no plasmídeo RSF1010, um plasmídeo de amplo espectro com 8.684 pb que pode replicar na maioria dos actinomicetos (39). Este plasmídeo também está relacionado com outra APH - *aph (3'') -Ib*, adjacente a *aph (6) -Id* (40). Devido à disseminação deste fragmento de DNA, os genes *aph (6) -Id* e *aph (3'') -Ib* foram encontrados tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-

negativas. As enzimas APH (3') induzem resistência à amicacina, canamicina e neomicina (41).

- As adeniltransferases (ANT) são responsáveis pela transferência do grupo adenosina monofosfato (AMP) do ATP para o grupo hidroxila (-OH) das moléculas de aminoglicosídeos. São identificadas cinco classes dessa enzima, incluindo ANT (2''), (3''), (4'), (6) e (9). A ANT (2'')-Ia é uma enzima comumente codificada por plasmídeos e transposons, sendo amplamente distribuída como cassetes gênicos em integrons de classe 1 e 2 (42). Essa enzima é responsável pela resistência à gentamicina, tobramicina, dibecacina, sisomicina e canamicina em Enterobacterales e bacilos Gram-negativos não fermentadores (34) . Embora sejam encontradas com menos frequência em enterobactérias e *P. aeruginosa* em comparação com AACs e APHs, as ANTs ainda desempenham um papel crucial na resistência bacteriana aos AGs (37).

### 1.5.3 Modificação da Membrana Celular

A modificação da membrana celular é um mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos que se baseia na diminuição da permeabilidade da membrana celular à entrada desses antimicrobianos. Esse mecanismo ocorre quando há alterações nas proteínas ou porinas, que formam canais através dos quais os AGs normalmente penetram na célula bacteriana. Além disso, a expressão de bombas de efluxo também pode contribuir para a redução da entrada dos AGs na célula, pois essas proteínas atuam no transporte ativo de substâncias para fora da célula, incluindo os AGs (16).

## 1.6 Combinação com outros agentes antibacterianos

### 1.6.1 Meropenem

O meropenem é um antibiótico carbapenêmico de amplo espectro com atividade bactericida contra muitas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Ele age efetivamente contra as enterobactérias ao se ligar fortemente às proteínas ligadoras de

penicilina 2 (PBP2), PBP3 e PBP4, o que impede a síntese da parede celular desencadeando a lise das células bacterianas (43).

No entanto, com o aumento dos valores de concentração inibitória mínima dos microrganismos, a monoterapia com meropenem, mesmo em doses máximas recomendadas pelo fabricante, pode não ser suficiente para alcançar os níveis farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) e manter a eficácia terapêutica (44). Por isso, a combinação de meropenem com outros agentes, como a polimixina B (PMB), pode ser uma estratégia eficaz para tratar infecções resistentes. Além da sinergia de subpopulação, comumente observada com a combinação de antibióticos, pode ainda maximizar a sinergia mecanista, melhorando a atividade antibacteriana e diminuindo a emergência de resistência (45).

Por outro lado, um estudo avaliou a eficácia *in vitro* da plazomicina combinada com outros antimicrobianos contra isolados clínicos resistentes a carbapenêmicos de *A.baumannii*, sendo observado que houve um efeito sinérgico nas combinações de plazomicina com meropenem e imipenem (46).

#### 1.6.2 Colistina

A colistina, também conhecida como polimixina E, é um antibiótico polipeptídico que pertence à classe das polimixinas. É frequentemente usada como último recurso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos, como as enterobactérias. A colistina age ligando-se às membranas celulares bacterianas e causando danos, levando à morte das células bacterianas (47).

No entanto, a resistência à colistina tem sido já relatada em vários países, tornando a terapia combinada com dois ou mais antibióticos a única opção restante. A resistência às polimixinas pode surgir devido a modificações na membrana externa, como mudanças nos lipopolissacarídeos (LPS) ou a presença de bombas de efluxo, que podem remover os antibióticos da célula bacteriana. A emergência de cepas bacterianas resistentes às polimixinas é uma preocupação crescente em ambientes de cuidados de saúde, e esforços estão em andamento para desenvolver novos antibióticos que possam tratar efetivamente essas infecções (48).

O fato de que isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC (KPC-Kp) não são apenas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, mas também são frequentemente



resistentes a uma variedade de outros antibióticos, incluindo colistina e aminoglicosídeos representa um problema no tratamento. A modulação da expressão do gene *mgrB*, responsável por vias bioquímicas envolvidas na modificação do LPS, tem sido frequentemente associada à resistência a polimixinas em cepas clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC (49). Além disso, a disseminação horizontal do gene *mcr-1* e seus derivados por meio de conjugação representa uma ameaça considerável, comprometendo a eficácia dos antibióticos e contribuindo para o aumento da resistência antimicrobiana (50).

### 1.6.3 Ceftazidima/avibactam

Ceftazidima/avibactam (CZA) é uma nova combinação de um  $\beta$ -lactâmico com inibidor de  $\beta$ -lactamase sintético, que apresenta uma boa atividade contra bactérias Gram-negativas, especialmente enterobactérias. A ceftazidima é uma cefalosporina de amplo espectro que inibe a ligação cruzada do peptidoglicano durante a síntese da parede celular, levando à lise e morte da célula bacteriana. Avibactam é um inibidor de  $\beta$ -lactamases de primeira classe, não  $\beta$ -lactâmico, que contribui para a atividade da CZA protegendo a ceftazidima da degradação por uma variedade de serina  $\beta$ -lactamases (51).

Embora essa combinação esteja disponível clinicamente há apenas alguns anos, casos de resistência já foram relatados. Algumas cepas de bactérias apresentam resistência à ceftazidima/avibactam devido a mutações em enzimas AmpC ou carbapenemases (52). Alguns casos de resistência foram relacionados a mutações no KPC-3 carregado por plasmídeos. Curiosamente, foi observado que algumas mutações no KPC-3 que conferiam resistência à ceftazidima/avibactam estavam associadas à diminuição da concentração inibitória mínima de carbapenêmicos e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (53). Por outro lado, a atividade de CZA também tem mostrado ação *in vitro* na associação com aztreonam contra enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases da classe B (54). Já outros estudos relataram redução no desenvolvimento de resistência quando polimixina e ceftazidima/avibactam são combinados com outros antibióticos (55).

### 1.7 Eficácia dos estudos de sinergismo *in vitro* e *in vivo*

Por causa do panorama atual da resistência bacteriana que tem comprometido os principais esquemas terapêuticos, os novos estudos pretendem investigar diferentes combinações entre antibióticos. Dado que o uso de dois ou mais antimicrobianos, minimiza a probabilidade de apresentar cepas com padrão de resistência aos demais antimicrobianos utilizados.

Na literatura, existem poucos estudos de pesquisa comparando o efeito da terapia combinada *versus* a monoterapia, muitos dos quais são estudos retrospectivos ou casos limitados pelo tamanho da amostra (56), (57). Não obstante, para infecções por bactérias Gram-negativas, o sinergismo antimicrobiano tem como seu principal exemplo as combinações de aminoglicosídeos com  $\beta$ -lactâmicos, o que permite mecanismos de destruição bacteriana combinados (58), (59). Neste contexto, os aminoglicosídeos tentam representar opções terapêuticas através da combinação com outras drogas, como por exemplo, o fenômeno de sinergismo *in vitro* entre a tigeciclina e amicacina contra *A. baumannii* multirresistente (60), (61).

Além disso, o sinergismo dos aminoglicosídeos com vários  $\beta$ -lactâmicos tem sido evidenciado *in vitro* e *in vivo* contra *Enterococci*. Os aminoglicosídeos são frequentemente usados em combinação com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, em especial os carbapenêmicos, pois alteram a permeabilidade da membrana e podem agir como moduladores da resposta dos carbapenêmicos, como representado na Figura 5 (62). Entretanto, a frequência de sinergismo é menor com as penicilinas de amplo espectro, como a carbenicilina, tal como, outras drogas como imipenem e ciprofloxacina (63).

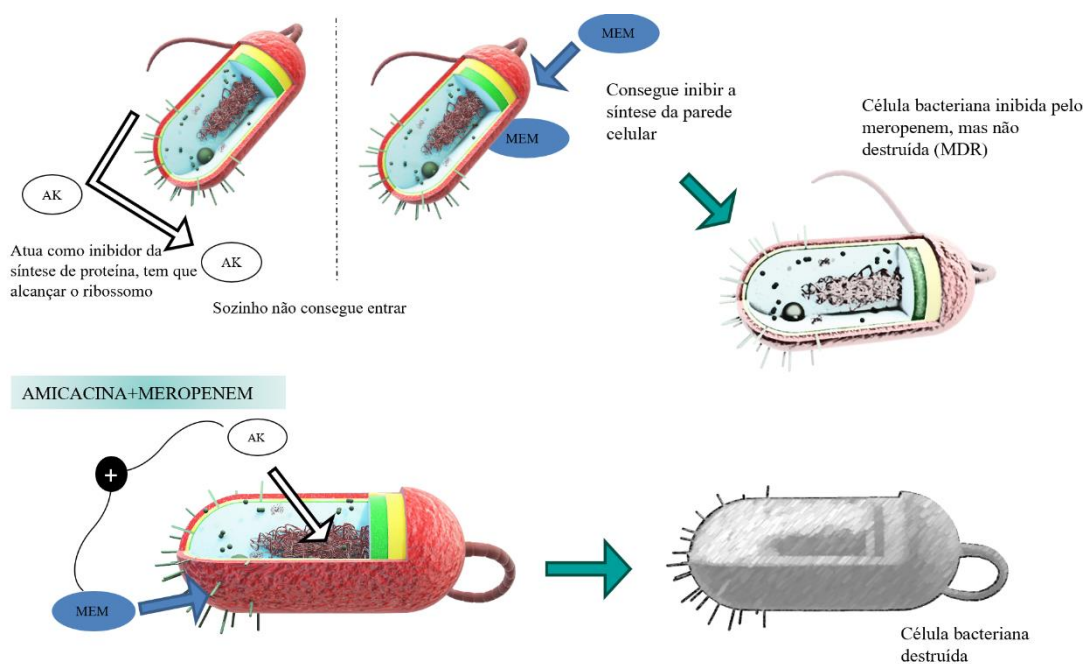


Figura 4. Imagem ilustrativa da interação antimicrobiana ao nível celular.

O efeito sinérgico em cepas de *A. baumannii* multirresistente foi demonstrado na combinação dos antibióticos colistina e vancomicina, exibindo uma redução na CIM de vancomicina de  $> 256 \mu\text{g/ml}$  a  $< 48 \mu\text{g/ml}$ , após exposição a  $0,5 \mu\text{g/ml}$  de colistina, em pelo menos um dos métodos testados (*time-kill*, E-test e microdiluição) (64). Do mesmo modo, a combinação de ceftazidima/avibactam foi ativa em cepas de *S. marcescens* multirresistentes e o efeito sinérgico entre os antibióticos CZA e meropenem apresentou boa correlação com o método de disco aproximação (65).

Dentre os novos estudos desenvolvidos, pelo aumento da resistência aos antibióticos do grupo das polimixinas, a combinação de colistina com rifampicina e colistina com vancomicina mostraram um maior efeito sinérgico contra os isolados de *A. baumannii* multirresistente. Essa combinação já foi sugerida na terapia das infecções por esse microrganismo (61). Uma nova pesquisa, apresentou dados que avaliaram a interação entre o meropenem em combinação com aminoglicosídeos em enterobactérias produtoras de KPC e carbapenemases, exibindo um forte efeito sinérgico entre as drogas (66).

Um outro estudo recente avaliou o efeito da colistina em combinação com outras drogas, os resultados revelaram que as combinações de colistina com amicacina ou fosfomicina mostraram sinergismo contra 72,72% (8 de 11 isolados), que podem inibir eficazmente isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à colistina e, portanto, podem ser explorados para o tratamento de patógenos multiresistentes (67).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram dados promissores da interação de antimicrobianos, sobre o risco de mortalidade entre os pacientes graves infectados por microrganismos multidroga-resistentes (MDR) (68). No caso da fosfomicina, as elevadas CIM em cepas multiresistentes têm sido consideradas um desafio para a monoterapia. No entanto, estudos têm evidenciado a interação entre fosfomicina e meropenem com queda das CIM tanto de fosfomicina quanto do meropenem (apesar de elevados). O sinergismo entre as duas drogas aconteceu na maioria dos isolados de bactérias Gram-negativas multiresistentes (69).

Adicionalmente, uma revisão sistemática que incluiu 53 estudos *in vivo* (4.514 pacientes) revelou que a mortalidade geral em séries de casos e estudos de coorte foi menor em pacientes tratados em terapia combinada do que em monoterapia (56).

As orientações da European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) sobre o uso de terapia combinada em pacientes infectados com bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenêmicos (CR-GNB) baseiam-se em fatores como a sensibilidade da bactéria aos diferentes tipos de antibióticos disponíveis, a gravidade da infecção e os fatores de risco do paciente. A recomendação é que diferentes classes de antibióticos, incluindo carbapenêmicos, polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sejam usadas em combinação para maximizar a eficácia do tratamento. Em infecções graves e de alto risco por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB), foi sugerido terapia combinada com dois antibióticos ativos *in vitro* entre os antibióticos disponíveis (70).

Então, a probabilidade de que a terapia antimicrobiana forneça uma cobertura adequada e maior potência para os patógenos que causam uma infecção aumenta com o uso de dois agentes antimicrobianos (1). Os pesquisadores da terapia combinada referem-se ao sinergismo *in vitro* e à supressão do desenvolvimento de cepas resistentes como a alternativa mais sustentável (71).

No Brasil, os estudos sobre efeitos sinérgicos têm sido esporádicos e restritos a cepas não produtoras de carbapenemases (72),(73). Assim, devido à resistência aos carbapenêmicos e à dificuldade no desenvolvimento de novas drogas é necessário pesquisar ainda mais sobre o desempenho dos aminoglicosídeos, sendo que sua atividade talvez possa ser significativamente aumentada pela associação com outros antibióticos. Dessa forma, o uso de combinações de aminoglicosídeos deve ser cuidadosamente examinado em cepas de espécies distintas e com mecanismos de resistência diversos, para evitar o surgimento de nova resistência e possivelmente servir de base para estudos clínicos envolvendo tal estratégia terapêutica.

### **1.8 Métodos de sinergismo *in vitro***

Embora vários métodos de sinergismo estejam disponíveis para determinar a interação entre agentes antimicrobianos, ainda precisam ser padronizados. O *time-kill*, *checkerboard*, teste epsilométrico e o disco aproximação são os métodos mais usadas na prática clínica e em estudos de pesquisa. Estudos *in vitro* precisam ser executados através do desempenho e concordância de métodos (74), (75).

#### **1.8.1 *Time-kill***

O *time-kill* (TK) ou curva da morte é considerado o método padrão ouro para a determinação do sinergismo antimicrobiano. Esse é um método usado para examinar a taxa na qual as concentrações de um antimicrobiano matam um isolado bacteriano. Nesse ensaio, uma cultura bacteriana é exposta a uma concentração fixa de um ou mais antimicrobianos, e a viabilidade bacteriana é avaliada em intervalos de tempo regulares. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) é realizada para determinar a eficácia bactericida ou bacteriostática do antimicrobiano em questão, além de permitir a construção de curvas de crescimento. Esse método é útil para avaliar a eficácia de combinações de antimicrobianos (76).

Além disso, o *time-kill* é frequentemente utilizado para testar novas drogas, a interação entre antimicrobianos dependentes da concentração e dependentes do tempo, para avaliar o efeito paradoxal, persistente ou tolerância da droga (77). Resultados promissores têm sido encontrados, comparando o método padrão ouro com os novos métodos de sinergismo antimicrobiano (78), (79).

### 1.8.2 *Checkerboard* (Tabuleiro)

O método de *checkerboard* é um dos mais utilizados para determinar o sinergismo entre antimicrobianos *in vitro*. Este método consiste em testar diferentes combinações de agentes antimicrobianos em uma cultura bacteriana no formato de matriz para determinar a CIM (80).

A combinação de cada diluição é testada para determinar o efeito da combinação sobre o crescimento bacteriano. A interpretação do teste de *checkerboard* é realizada utilizando um cálculo matemático para determinar o efeito da combinação dos antimicrobianos, conhecido como índice de concentração inibitória fracionada (ICIF, na sigla em português). O FICI é calculado a partir dos valores da CIM de cada agente antimicrobiano quando usado sozinho e em combinação (81). No entanto, uma limitação deste método é que ele fornece apenas dados da atividade inibitória e não bactericida da combinação (82).

### 1.8.3 Teste epsilométrico (E-test)

Outro método de sinergismo é o teste Epsilométrico, considerado o mais novo para analisar associação entre os antibióticos. A técnica utiliza o mesmo padrão de inóculo ao teste de disco-difusão em placas de ágar Mueller Hinton (MH) segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (83), (84). O teste é realizado colocando fitas de gradiente no agar Mueller-Hinton em formação cruzada, com um ângulo de 90 graus na interseção entre as escalas em suas respectivas CIMs para o microrganismo.

A exceção do que é realizado no método *checkerboard*, a natureza da interação medicamentosa foi determinada com base no índice FICI calculado, que é obtido dividindo a CIM do antimicrobiano usado em combinação pela CIM do mesmo antimicrobiano usados isoladamente. A leitura da CIM é feita na intersecção da zona de inibição de cada fita, entretanto, o efeito sinérgico é interpretado pela observação da queda da CIM de ambos antibióticos na zona de interseção (82). Esse método pode ser usado como uma alternativa a outros métodos para determinar as interações medicamentosas, com precisão e reprodutibilidade semelhantes.

#### 1.8.4 Disco aproximação

O disco aproximação (DA) é um método que fornece dados qualitativos. A simplicidade e o uso de materiais disponíveis como discos comerciais e placas de ágar MH representam as principais vantagens para o uso no laboratório microbiológico de rotina (74). O teste de sinergismo pelo método de disco aproximação é mais simples, através da técnica de difusão em disco, analisando as zonas de inibição em torno dos discos contendo os 2 antibióticos aproximados na superfície de uma placa de ágar MH semeada com o microrganismo testado. No entanto, uma desvantagem do método é que o gradiente produzido na difusão dos antimicrobianos não tem uma correlação clara com as concentrações atingíveis, mas os dados qualitativos podem se utilizar como uma triagem de sinergismo (65).

## 2. JUSTIFICATIVA

Existem múltiplos mecanismos de resistência que podem ser expressos por bactérias Gram negativas, principalmente enterobactérias. Esses mecanismos conferem uma resistência natural ou adquirida a várias classes de antibióticos, reduzindo consideravelmente as opções de tratamento. Devido a emergência de cepas cada vez mais resistentes aos antimicrobianos disponíveis restando poucas opções terapêuticas e ao uso de antimicrobianos antigos, existe a necessidade crescente de estudos sobre interação entre aminoglicosídeos e outras drogas de uso frequente como os  $\beta$ -lactâmicos e as polimixinas, que possam ter os efeitos de sinergismo antimicrobiano *in vitro* determinados através de novos testes que possam ser utilizados na rotina microbiológica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar o sinergismo *in vitro* de aminoglicosídeos com outros antimicrobianos em bactérias gram-negativas multirresistentes de linhagens distintas e com mecanismos de resistência variados.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o desempenho do teste epsilométrico (E-test) na detecção de sinergismo *in vitro* de aminoglicosídeos com outros antimicrobianos;
- Avaliar o desempenho do disco aproximação na detecção de sinergismo *in vitro* de aminoglicosídeos com outros antimicrobianos;
- Comparar o teste epsilométrico e o disco aproximação na detecção de sinergismo *in vitro* de aminoglicosídeos com outros antimicrobianos;
- Caracterizar o perfil fenotípico e genotípico dos microrganismos, com relação aos aminoglicosídeos;
- Analisar a associação entre os genes de resistência e o efeito de sinergismo *in vitro*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local do estudo

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Investigação Médica em Protozoologia, Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana (LIM 49). O laboratório faz parte do quadrilátero da saúde e está vinculado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), localizado na cidade de São Paulo. O HCFMUSP é um complexo hospitalar terciário, público, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) com aproximadamente 2200 leitos, sete institutos e dois hospitais auxiliares.

### 4.2 Desenho do estudo

Estudo descritivo- transversal onde a seleção dos isolados foi feita pelo método não probabilístico, ou seja, por conveniência. Foram selecionados 72 isolados que apresentaram melhor caracterização fenotípica e genotípica por sequenciamento de genoma completo (SGC), além de representarem desafio no tratamento de infecções hospitalares.

### 4.3 Microrganismos

Foram selecionados 72 isolados que fazem parte do banco de microrganismos do laboratório de investigação médica (LIM49), coletados entre 2011 e 2020 e provenientes de amostras clínicas de pacientes de duas diferentes unidades hospitalares: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (n=66) e do Hospital Universitário de Londrina, PR (n=6). Foram selecionados isolados clínicos de *K. pneumoniae* (n=40), *S. marcescens* (n=12) e *A. baumannii* (n=20). Esses microrganismos foram isolados do sangue (n=37), aspirado traqueal (n=14), urina (n=6), líquidos de sítios estéreis (n=4), coleções intra-abdominal (n=4), *swab* retal (n=4), biopsia de Sistema Nervoso Central (n=2) e medula óssea (n=1) com perfil de resistência aos carbapenêmicos, polimixinas e aminoglicosídeos. Os isolados foram previamente identificados no sistema automatizado Vitek-2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA) e a identificação foi confirmada com o SGC.

Quadro 2. Informações dos 72 isolados selecionados para o estudo.

N	ID_LIM49	Microrganismo	Sítio Isolamento	Instituição	Ano_Coleta	Metodologia_SGC
1	955	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	Londrina	2011	<i>Ilumina</i>
2	964	<i>K. pneumoniae</i>	Tecido SNC	Londrina	2011	<i>Ilumina</i>
3	986	<i>K. pneumoniae</i>	Urina	Londrina	2011	<i>Ilumina</i>
4	1198	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	Londrina	2012	<i>Ilumina</i>
5	1372	<i>K. pneumoniae</i>	Medula Óssea	Londrina	2012	<i>Ilumina</i>
6	1714	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
7	1721	<i>K. pneumoniae</i>	Urina sonda vesical	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
8	1738	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	Londrina	2013	<i>Ilumina</i>
9	1787	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
10	1799	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
11	1830	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
12	1849	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue de Cateter	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
13	1853	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue de Cateter	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
14	2005	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	HCFMUSP	2012	<i>Ilumina</i>
15	2162	<i>K. pneumoniae</i>	Swab Retal	HCFMUSP	2013	<i>Ilumina</i>
16	4182	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
17	4219	<i>K. pneumoniae</i>	Líquido Ascítico	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
18	4223	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
19	4224	<i>K. pneumoniae</i>	Líquido Ascítico	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
20	4229	<i>K. pneumoniae</i>	Coleção intra-abdominal	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
21	4234	<i>K. pneumoniae</i>	Coleção	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
22	4235	<i>K. pneumoniae</i>	Líquido Peritoneal	HCFMUSP	2014	<i>Ilumina</i>
23	4281	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
24	4290	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
25	4326	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
26	4448	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
27	4449	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
28	4451	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
29	4477	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue de Cateter	HCFMUSP	2015	<i>Ilumina</i>
30	4490	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
31	4553	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
32	4993	<i>K. pneumoniae</i>	Secreção Traqueal	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
33	4998	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
34	5000	<i>K. pneumoniae</i>	Urina sonda vesical	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
35	5006	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
36	6186	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
37	6189	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue de Cateter	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>

38	6193	<i>K. pneumoniae</i>	Urina sonda vesical	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
39	6208	<i>K. pneumoniae</i>	Urina sonda vesical	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
40	6358	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2021	<i>IonTorrent</i>
41	923	<i>A. baumannii</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
42	939	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
43	941	<i>A. baumannii</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
44	994	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
45	997	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
46	1011	<i>A. baumannii</i>	Cateter	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
47	1013	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
48	1018	<i>A. baumannii</i>	Líquido ascítico	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
49	1029	<i>A. baumannii</i>	Cateter	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
50	1049	<i>A. baumannii</i>	Cateter	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
51	1099	<i>A. baumannii</i>	LBA	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
52	1126	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
53	1128	<i>A. baumannii</i>	Swab	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
54	1132	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
55	1819	<i>A. baumannii</i>	Swab	HCFMUSP	2018	<i>Ilumina</i>
56	6096	<i>A. baumannii</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
57	6196	<i>A. baumannii</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
58	6197	<i>A. baumannii</i>	Sangue Periférico	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
59	6212	<i>A. baumannii</i>	Secreção traqueal	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
60	6418	<i>A. baumannii</i>	Swab	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
61	630	<i>S. marcescens</i>	Sangue de cateter	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
62	642	<i>S. marcescens</i>	Sangue de cateter	HCFMUSP	2016	<i>Ilumina</i>
63	1052	<i>S. marcescens</i>	LBA	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
64	1058	<i>S. marcescens</i>	Cateter	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
65	1309	<i>S. marcescens</i>	Sangue periférico	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
66	1510	<i>S. marcescens</i>	Sangue periférico	HCFMUSP	2017	<i>Ilumina</i>
67	1756	<i>S. marcescens</i>	Sangue de cateter	HCFMUSP	2018	<i>Ilumina</i>
68	1763	<i>S. marcescens</i>	Líquido corporal	HCFMUSP	2018	<i>Ilumina</i>
69	5880	<i>S. marcescens</i>	Urina	HCFMUSP	2019	<i>IonTorrent</i>
70	5932	<i>S. marcescens</i>	Líquor	HCFMUSP	2019	<i>IonTorrent</i>
71	6217	<i>S. marcescens</i>	Sangue de cateter	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>
72	6218	<i>S. marcescens</i>	Osso	HCFMUSP	2020	<i>IonTorrent</i>

Legenda: SNC, Sistema Nervoso Central; LBA, Lavado Bronco-alveolar

É importante mencionar que as amostras foram escolhidas de pacientes e unidades diferentes, perfis fenotípicos distintos, geográfica e temporalmente não relacionadas. O perfil genotípico dos isolados foi analisado através da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado, do inglês, “*Pulsed-field Gel electrophoresis*” (PFGE) para assegurar a variabilidade genética das cepas.

#### **4.4 Cepas de controle de qualidade**

Para todos os ensaios de acordo com as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020), foram utilizadas as seguintes cepas controle da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.5 Antimicrobianos usados no estudo**

As combinações de antimicrobianos foram escolhidas com base na evidência científica e por serem as opções terapêuticas mais usadas no tratamento de infecções causadas por esses patógenos no HC-FMUSP. Para os testes de sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão e os testes de sinergismo *in vitro* foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Amicacina (AK, 30µg, Becton-MD), gentamicina (GEN, 10µg, Becton-MD), meropenem (MEM, 10µg, Becton-MD), ceftazidima/avibactam (CZA, 30/20 µg, Becton-MD) e colistina (COL, 10µg, Oxoid-UK). Para o método de fita-gradiente foram utilizadas fitas de antimicrobianos (Etest; bioMérieux- BR). Para o método de microdiluição e *Time-kill* foram utilizados os seguintes sais antimicrobianos: (AK, 520 µg/mg), (COL, 683 µg/mg), (MEM, 873 µg/mg) e (CZA; 2 g de ceftazidima + 0.5 g de avibactam), seguindo os critérios de preparação estabelecidos pelo CLSI.

A combinações testadas pelo método de disco aproximação foram AK com MEM, AK com CZA AK com COL, GEN com MEM, GEN com CZA e GEN com COL. As combinações avaliadas pelo método epsilométrico (E-test, BioMérieux, Brasil) foram AK com MEM, AK com CAZ e AK com COL.

#### **4.6 Métodos para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos**

Os microrganismos antes de serem submetidos aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, foram reativados do estoque (BHI + glicerol, -80°C), semeados em ágar MacConkey e incubados por 24h a 37°C com disco comercial de meropenem. Para os ensaios fenotípicos uma suspensão bacteriana foi preparada utilizando a escala 0,5 de McFarland que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e sua densidade óptica foi medida por espectrofotômetro conforme preconizado pelo CLSI (2018).

A avaliação da sensibilidade foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

- A CIM de cada antimicrobiano foi previamente determinada pelo método de microdiluição em caldo para todos os isolados;
- A CIM para AMI, MEM, COL e CZA foi primeiramente determinada pelo método elipsométrico (E-test) para posterior avaliação de sinergismo *in vitro*;
- O método de Kirby-Bauer (Disco-difusão) utilizando discos comerciais dos antimicrobianos (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) foi utilizado para determinação do perfil de sensibilidade dos antimicrobianos do estudo e posterior avaliação de sinergismo *in vitro* pelo método de disco aproximação;
- Os resultados foram categorizados seguindo os critérios de interpretação do CLSI (2021) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021) apenas para colistina, e o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2022) para extrapolar os resultados de acordo com o contexto epidemiológico atual no Brasil. Para interpretação do resultado de CZA nos isolados de *A. baumannii* foram utilizados os pontos de corte de *Pseudomonas aeruginosa* preconizados pelo CLSI.

#### **4.7 Métodos de avaliação de sinergismo *in vitro***

##### **4.7.1 Método epsilométrico (E-test) Ângulo de 90°**

Para o ensaio de sinergismo por E-test, cada isolado foi submetido a determinação da CIM isoladamente para cada antimicrobiano usando fitas de E-test. A seguir, o isolado foi submetido ao cruzamento das fitas no ângulo de 90° no encontro das duas CIM dos antimicrobianos previamente determinados (75) (Figura 6).

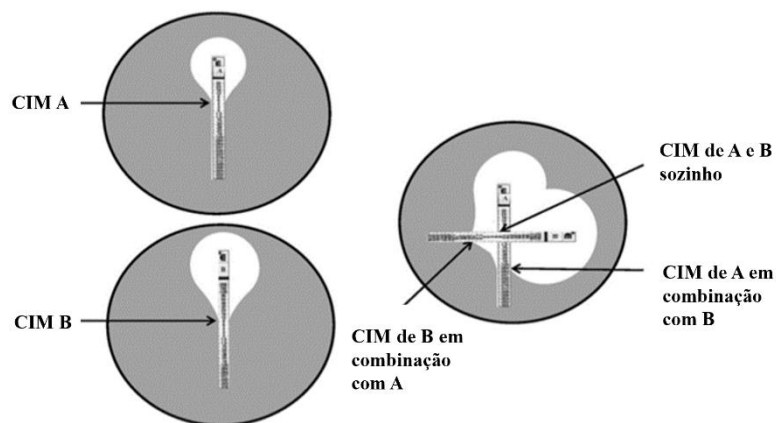


Figura 5. Diagrama da montagem da fita para o método de sinergismo E-test. (Adaptada de Mubin Kazi, et al., 2018)

Para interpretação do efeito sinérgico, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI) para cada antimicrobiano, pela seguinte fórmula:

$$\sum CIF = \frac{(CIM \text{ da droga A em combinação})}{(CIM \text{ da droga A sozinha})} + \frac{(CIM \text{ da droga B em combinação})}{(CIM \text{ da droga B sozinha})}$$

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: sinergismo se  $FICI \leq 0,5$ ; aditivo se  $FICI > 0,5$  e  $< 1$ ; indiferente se  $FICI \geq 1$  e  $\leq 4$  e antagonismo se  $FICI > 4$  (82), (81).

#### 4.7.2 Método de Disco aproximação

O método de disco aproximação permite avaliar de forma qualitativa a interação entre antibióticos. De acordo com o CLSI, os discos de antibióticos são dispostos sobre as placas de ágar Mueller Hinton com o inóculo bacteriano preparado de forma similar ao método de disco difusão (DD). A distância tem que ser igual ou maior do que a soma dos diâmetros dos halos de inibição quando cada antibiótico é testado sozinho. Após 16 a 18 horas de incubação pode se interpretar a interação entre os antimicrobianos (85), (65).

Dessa forma, inicialmente, os diâmetros dos halos dos isolados para cada antimicrobiano foram determinados isoladamente e, posteriormente, no ensaio de sinergismo, os discos foram dispostos a uma distância de soma dos raios dos halos dos

antimicrobianos a serem testados (84). Quando não há alteração dos halos de inibição, o resultado é de “indiferença”. Quando se observa um aumento da zona de inibição entre os discos testados ou a formação de uma zona fantasma, o resultado é de “sinergismo”. Por último, quando observa-se uma distorção do halo na interface das áreas de inibição, com maior crescimento bacteriano, o efeito é de “antagonismo”(86) (Figura 7).

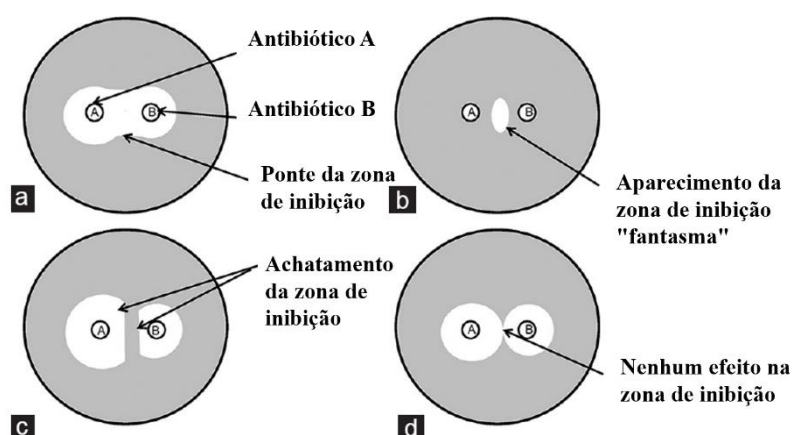


Figura 6. Diagrama do ensaio para o método de sinergismo de disco aproximação. Na figura A e B destaca-se o efeito de sinergismo, na figura c, o efeito de antagonismo e na figura d, o efeito de indiferença. Adaptada de (Mubin Kazi, et al., 2018).

#### 4.7.3 Método de *Time-Kill* (Curva de morte)

Os antibióticos foram testados em diferentes concentrações (1X CIM e 0,5X CIM), a partir dos dados de microdiluição em caldo. Os resultados de sinergismo foram definidos como diminuição de  $\geq 2 \log_{10}$  no número de colônias da combinação em comparação com os antimicrobianos testados sozinhos após 24 horas e no tempo 0h (direto da suspensão bacteriana); Indiferente quando não houve aumento ou diminuição de  $< 2 \log_{10}$  da combinação; e Antagonismo quando houve aumento de  $\geq 2 \log_{10}$  da combinação em comparação com os antimicrobianos sozinhos (87), (88) (Figura 8).

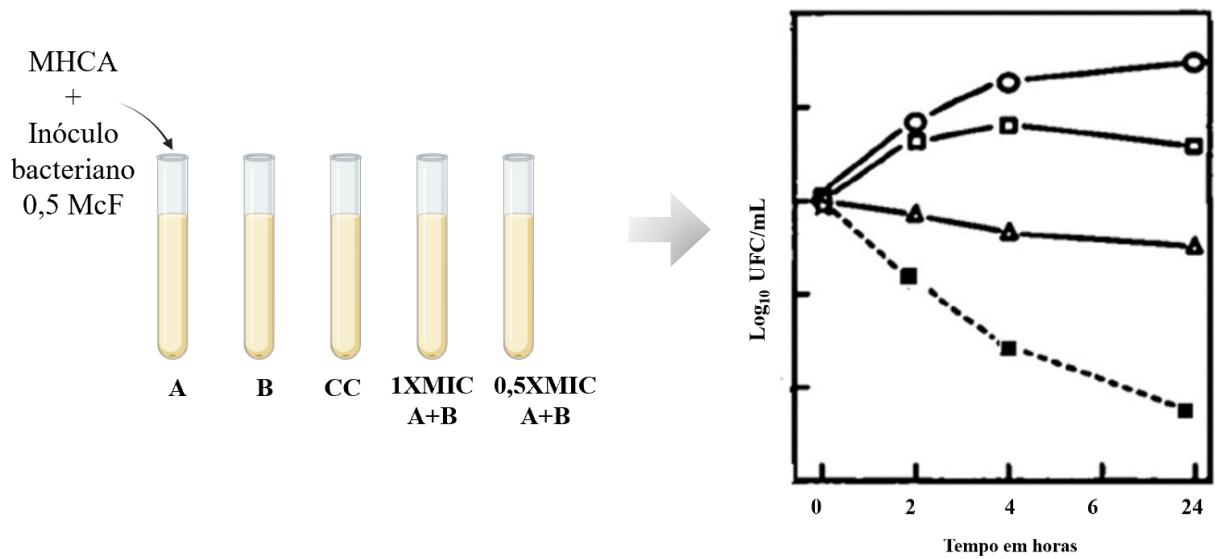


Figura 7. Cinética da curva de morte que demonstra o crescimento dos microrganismos. Nas representações de nenhuma droga (círculos), adição de droga A (quadrados abertos), adição de droga B (triângulos) e adição de ambas as drogas A e B (quadrado fechado). Legendas: MHCA: Muller Hinton Cátion Ajustado; A: droga A; B: droga B; CC: controle de crescimento; CIM: concentração inibitória mínima

#### 4.8 Tipos de erros de interpretação e concordância entre os testes

Os critérios de classificação dos tipos de erros foram interpretados seguindo as recomendações da *Food and Drugs Administration* (FDA) e da *International Organization for Standardization* (ISO 20776), direcionado aos testes de sensibilidade de agentes infecciosos e avaliação do desempenho dos métodos de sensibilidade antimicrobiana e teste de sinergismo *in vitro* (89) (Quadro 3).



Quadro 3. Tipos de erros de interpretação nos testes de sinergismo *in vitro*.

Tipos de erros	Interpretação	Cálculo
Erro menor	Resultado do teste pelo método de referência interpretado como Indiferente ou Sinergismo, e um resultado do método avaliado de Sinergismo ou Indiferente, respectivamente.	$\frac{N_M \times 100\%}{N}$
Erro grave	Resultado do teste pelo método de referência interpretado como Sinergismo, e um resultado do método avaliado como Antagonismo.	$\frac{N_G \times 100\%}{N_{ISMR}}$
Erro muito grave	Resultado do teste pelo método de referência interpretado como Antagonismo, e um resultado do método avaliado como não antagonismo.	$\frac{N_{MG} \times 100\%}{N_{IAMR}}$

$N_m$ : número total de isolados que apresentaram erro menor,  $N$ : número total de isolados testados,  $N_G$ : número total de isolados que apresentaram erro grave,  $N_{ISMR}$ : número de isolados sinérgicos pelo método de referência,  $N_{MG}$ : número total de isolados que apresentaram erro muito grave,  $N_{IAMR}$ : número de isolados antagonísticos pelo método de referência.

A Concordância categórica (CC) e concordância essencial (CE) foram definidas usando critérios padronizados (90). A CC é definida como a concordância nos resultados interpretativos (ou seja, classificar o isolado como sensível, intermediário ou resistente) entre o teste referência (microdiluição) e o Epsilométrico ou disco difusão. A CE é definida como concordância dentro de  $\pm 2$  vezes da diluição entre a CIM da microdiluição e o Epsilométrico.

#### 4.9 Sequenciamento do Genoma Completo

Cinquenta e dois isolados de 2011 a 2016 foram previamente sequenciados pela tecnologia de MiSeq Illumina™. O DNA total foi extraído usando o *kit* *illustra* *bacteria* *genomic* *Prep* *Mini* *Spin* (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA) e o *QiAamp* *DNA* *mini* *kit* (Qiagen). A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific, Delaware, USA). A concentração do DNA foi verificada utilizando-se o fluorômetro *Qubit*® (Thermo Scientific, Delaware, USA) e a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5%. As bibliotecas foram preparadas com o *kit* comercial *Nextera* *XT* *Illumina*™ de acordo com as instruções do

fabricante. Este *kit* usa um transposon para simultaneamente fragmentar e marcar o DNA com adaptadores. A seguir, o DNA foi amplificado com uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e marcado com índices. A qualidade das bibliotecas geradas foi avaliada em sistema TapeStation (Agilent, Santa Clara, USA). Segmentos pareados de leitura (*paired end reads*) com mais de 500 pares de bases foram processados na plataforma de sequenciamento MiSeq Illumina™ da Rede Premium de multiusuários da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Laboratório de Investigação Médica 15 – LIM15, locado na Faculdade de Medicina da USP.

Os outros 20 isolados de 2016 a 2020 foram sequenciados pela plataforma *Ion Torrent* (ThermoFisher Scientific) utilizando kit comercial para preparação de bibliotecas Ion Xpress™ Plus Fragment Library de acordo com as instruções dos fabricantes. A plataforma de sequenciamento *Ion Torrent* faz parte do sistema multiusuários localizado no Laboratório de Investigação Médica 46, no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP.

A qualidade dos arquivos gerados no sequenciamento por *Illumina* foram avaliadas pelos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33. Foi realizada a montagem do genoma *de novo* usando-se os programas VelvetOptimiser v. 2.2.5, Spades v. 3.13.0 ou Mira v. 4.0.2. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1 usando-se as cepas referências *A. baumannii* ATCC17978 (Acesso GenBank: CP000521), *S. marcescens* CAV1492 (Acesso GenBank: NZ\_CP011642.1), e *K. pneumoniae* MGH78578 (Acesso GenBank: CP000647), cujos genomas estão disponíveis no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) . O genoma foi anotado com o programa Prokka v. 1.11 para os dados obtidos pelo *Illumina*. Entretanto, para os arquivos gerados pela plataforma Ion Torrent utilizou-se o programa Bacterial and Viral Bioinformatics Resource center (Patric v.3.28.21) para montagem e anotação das *reads* obtidas.

Posteriormente, os genes que apresentaram uma relação significativa pelo teste de *Fisher* em relação a presença de sinergismo ou indiferença foram alinhados utilizando a ferramenta Clustal-Omega, a fim de identificar a presença de SNPs ou mutações entre os grupos. A partir da sequência consenso gerada, foi extraída a região do gene utilizando o programa Geneious Prime v. 2021.2.2.

O *Multilocus sequence typing* (MLST), genes de resistência adquiridos (como as EMAs e metilase) e plasmídeos foram verificados utilizando-se os programas MLSTfinder (91), ResFinder (92) e PlasmidFinder (93), respectivamente. Uma curadoria manual foi realizada com o intuito de verificar outros mecanismos de resistência que poderiam estar relacionados a resistências aos aminoglicosídeos, como proteínas de membrana externa (mutações, deleções e inserções) e a presença de bombas de efluxo. Os mecanismos de resistência pesquisados estão descritos no Quadro 4. Mutações nos genes e regiões promotoras, deleções e inserções e/ou genes presentes em elementos genéticos móveis associados a resistência aos aminoglicosídeos foram manualmente buscados utilizando o programa Artemis 16.0.0 (94) e confirmadas pelo programa BLAST2Seq (95). As mutações dos genes de resistência aos aminoglicosídeos foram avaliadas utilizando o programa Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) para determinar se são mutações sinônimas ou não sinônimas. (96)

Quadro 4. Mecanismos de resistência relacionados a resistências aos aminoglicosídeos

<b>Microrganismo</b>	<b>Proteínas de membrana externa</b>	<b>Bombas de efluxo (família)</b>
<i>K. pneumoniae</i>	ompK36 ompK37 ompK35	RND MFS ABC
<i>A. baumannii</i>	OmpA CarO OprD	RND MATE SMR MFS
<i>S. marcescens</i>	OmpF OmpC	MFS RND

Legenda: Omp, Outer membrane protein; RND, Resistance Nodulation Division; MFS, Major Facilitator Superfamily; ABC, ATP Binding Cassette; SMR, Small Multidrug Resistance; MATE, Multidrug and Toxic Compound Extrusion.

#### 4.10 Análises dos resultados

Os testes estatísticos e gráficos foram executados nos softwares SPSS v26 e no GraphPad Prism v9. Para avaliar a concordância nos testes de sensibilidade (microdiluição, disco difusão e Epsilométrico) dos antimicrobianos testados foi utilizada a medida de concordância *Kappa de Fleiss*. Para avaliar a concordância entre os métodos de sinergismo (disco aproximação e Epsilométrico) nas três combinações de antibióticos (AK + COL, AK + MEM, AK + CZA) foi utilizado o teste de *Kappa de Cohen* proposta

por Fleiss e colaboradores (1981), onde  $k < 0,40$  é considerado uma concordância pobre,  $k = 0,40 - 0,75$  uma concordância boa e  $k > 0,75$  concordância muito boa.

Por meio do teste estatístico qui-quadrado foi avaliada a associação entre todas as combinações e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. O teste exato de *Fisher* foi utilizado para avaliar a associação entre os resultados de sinergismo e a combinação antimicrobiana para cada espécie. Por último, o Teste de *Kruskal-Wallis* com o método de *Dunn* foi realizado para a comparação entre os grupos para avaliar se há diferenças significativas entre os valores das CIM dos aminoglicosídeos na presença de um determinado gene.

Foram considerados significantes todos os resultados com nível descritivo menor que 5% (valor de  $p < 0,05$ ).

#### **4.11 Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, tendo como número de aprovação: 5.283.703.

#### **4.12 Fluxograma de trabalho**

A Figura 9 foi elaborada para descrever o fluxo das atividades realizadas durante o estudo.

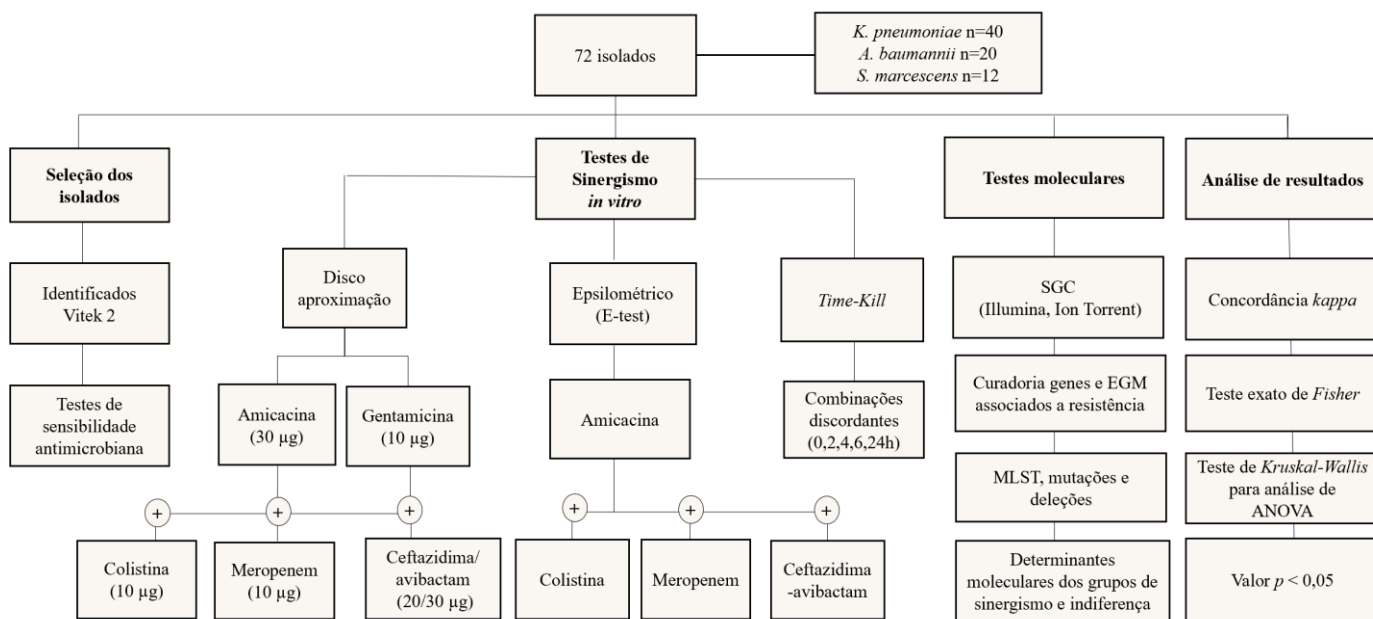


Figura 8. Fluxograma representando as atividades desenvolvidas durante o estudo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados

A sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, teste epsilométrico e disco-difusão. Os perfis de sensibilidade foram determinados e interpretados de acordo com EUCAST para COL e CLSI para os outros antimicrobianos. Todos os resultados de sensibilidade observados foram comparados com o documento do BrCAST 2023.

Nos isolados de *K. pneumoniae*, 90,0 % (36/40) eram resistentes ao MEM, 87,5% (35/40) apresentaram resistência a COL, 42,5 % (17/40) resistentes a AMI, 72,5% (29/40) apresentaram resistência a GEN e 2,5% (1/40) resistentes a CZA. Nas cepas de *A. baumannii*, a resistência ao MEM e CZA foi observada em 100% (20/20) dos isolados, 80,0% (16/20) dos isolados eram resistentes a COL, já para AK a resistência foi observada em 70% (14/20) dos isolados, 25,0% (5/20) apresentaram resistência a gentamicina. Entre os isolados de *S. marcescens* 83,3% (10/12) eram resistentes ao MEM, 58,3% (7/12) apresentaram resistência a AK e 41,7% (5/12) a gentamicina. Nenhum dos isolados de *S. marcescens* apresentou resistência a CZA. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, porcentual de resistência (CLSI, BrCAST), CC, CE e tipos de erros de todos os antibióticos testados nesse estudo estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Determinação da sensibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo, fita de gradiente e disco difusão para os antibióticos testados.

Microrganismo	Antibiótico	Microdiluição			Resistência (%)		Teste epsilométrico (Etest)			Disco difusão	
		Intervalo (mg/L)	CIM50	CIM90	CLSI	BrCAST	n° CE (%)	n° CC (%)	n° erro (categoria)	n° CC (%)	n° erro (categoria)
<i>K. pneumoniae</i> (n=40)	AK	≤ 4 - > 256	16	64	42,5	52,5	33 (83)	38 (95)	2 (M)	34 (85)	4 (M); 2 (G)
	GEN	≤ 0,5 - > 256	64	>256	75	82,5	-	-	-	36 (90)	2 (MG); 2 (M)
	COL*	0,5 - 64	12	32	87,5	87,5	39 (98)	39 (98)	1 (G)	40 (100)	0
	MEM	≤ 1 - 32	32	32	90	85	34 (85)	34 (85)	3 (MG); 3 (G)	36 (90)	3 (M); 1 (MG)
	CZA	0,5/0,125 - 16/4	4/1	8/2	2,5	2,5	34 (85)	39 (98)	1 (MG)	38 (95)	1 (MG); 1 (G)
<i>A. baumannii</i> (n=20)	AK	8 - > 32	> 32	> 32	65	95	19 (95)	17 (85)	3 (M)	18 (90)	1 (G); 1 (M)
	GEN	1 - 32	4	16	20	20	-	-	-	19 (95)	1 (G)
	COL*	0,5 - > 4	> 4	> 4	75	75	16 (80)	13 (65)	4 (G); 3 (M)	-	-
	MEM	8 - > 32	16	>32	100	100	20 (100)	19 (95)	1 (M)	20 (100)	0
	CZA	32/8 - 64/16	64/16	64/16	100	100	18 (90)	20 (100)	0	20 (100)	0
<i>S. marcescens</i> (n=12)	AK	4 - >32	32	> 32	41,6	75	11 (92)	8 (67)	3 (M); 1 (MG)	8 (67)	3 (M); 1 (MG)
	GEN	2 - 32	4	16	33,3	75	-	-	-	11 (92)	1 (G)
	COL	2 - > 4	> 4	> 4	100	100	12 (100)	12 (100)	0	-	-
	MEM	≤ 1 - >8	> 8	> 8	75	75	11 (92)	11 (92)	1 (MG)	10 (83)	2 (G)
	CZA	1/0,25 - 4/1	1/0,25	2/0,5	0	0	11 (92)	12 (100)	0	12 (100)	0

Legenda: AK, amicacina; GEN, gentamicina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, Ceftazidima/avibactam; CIM, concentração inibitória mínima; CE, concordância essencial; CC, concordância categórica; MG, erro muito grave; G, erro grave; M, erro menor.

\*Interpretação do EUCAST, 2022.

A comparação dos testes de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *K. pneumoniae* evidenciou uma forte concordância essencial (CE) das CIMs do Etest com as CIMs da microdiluição para colistina (CE=98%) e uma concordância menor para amicacina (83%), meropenem (85%) e CZA (CE=85%). No entanto, a concordância categórica foi acima de 85%, apenas com 3 erros muito graves para meropenem e 1 MG para CZA. No teste de disco difusão houve alto nível de correlação com a microdiluição mostrando a CC acima de 85%, 2 erros muito graves para gentamicina e 1 erro muito grave para MEM e CZA, respectivamente.

Nos isolados de *A. baumannii*, as CIMs do Etest foram fortemente correlacionadas com as CIMs da microdiluição para AK (CE=95%), MEM (CE=100%) e CZA (CE=90%), apresentando uma concordância menor para COL (CE = 80%). A análise de CC mostrou apenas 4 erros graves para COL e erros menores para os outros antimicrobianos. O teste de disco difusão apresentou um alto nível de correlação com a microdiluição mostrando uma CC acima de 90%, 1 erro grave e 1 erro menor para amicacina, e 1 erro grave para gentamicina.

As CIM do Etest nos isolados de *S. marcescens* foram fortemente correlacionadas, com as CIMs da microdiluição para todos os antibióticos (CE > 90%). No entanto, houve uma concordância categórica menor para amicacina (CC = 67%) com 1 erro muito grave e uma concordância categórica (CC = 92%) para meropenem com 1 erro muito grave. No teste de disco difusão, os isolados apresentaram baixa concordância categórica com a microdiluição para amicacina (CC = 67%) com 1 erro muito grave e 3 erros menores e, para meropenem uma concordância categórica de 83% com 2 erros graves.

## **5.2 Resultados de sinergismo**

### **5.2.1 Determinação de sinergismo pelo método Epsilométrico (E-test)**

O método E-test foi considerado na determinação da CIM e na avaliação da interação entre os antimicrobianos. Um total de 72,5% (29/40) dos isolados de *K. pneumoniae* apresentou efeito sinérgico na combinação de AK com COL, já para AK com MEM 47,5% (19/40) tinham efeito sinérgico para esta combinação e 40,0% (16/40) dos isolados apresentaram efeito sinérgico na combinação de AK com CZA. Nos isolados de *A. baumannii*, observou-se que 50,0% (10/20) tinham sinergismo na combinação de



AK com COL, enquanto 25% (5/20) apresentaram sinergismo na combinação de AK com MEM e, 55% (11/20) dos isolados com sinergismo na combinação de AK com CZA. Entre os isolados de *S. marcescens*, 33,3% (4/12) das amostras tinham efeito sinérgico na combinação de AK com MEM e, 75,0% (9/12) dos isolados com sinergismo na combinação de AK com CZA. As tabelas 2,3 e 4 apresentam os resultados dos efeitos encontrados nas combinações avaliadas nos isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens* respectivamente.

Tabela 2. Resultado do teste de sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de *K. pneumoniae* (n=40). Combinações apresentando sinergismo estão ressaltadas em verde (AMI+COL), rosa (AMI+MEM) e cinza (AMI+CZA).

ID	CIM (µg/mL)				COMB AMI+COL				COMB AMI+MEM				COMB AMI+CZA			
	COL	AK	MEM	CZA	AK	COL	FICI	Resultado	AK	MEM	FICI	Resultado	AK	CZA	FICI	Resultado
955	4 (R)	1 (S)	1,5 (I)	1 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	0,81	ADT	0,5 (S)	0,25 (S)	0,67	ADT	0,38 (S)	0,25 (S)	0,63	ADT
964	32 (R)	256 (R)	32 (R)	1,5 (S)	64 (R)	8 (R)	0,50	SIN	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	48 (R)	0,38 (S)	0,44	SIN
1198	2 (S)	6 (S)	1,5 (I)	2 (S)	2 (S)	0,125 (S)	0,40	SIN	2 (S)	0,19 (S)	0,46	SIN	1,5 (S)	0,75 (S)	0,63	ADT
1372	64 (R)	256 (R)	32 (R)	0,19 (S)	128 (R)	3 (S)	0,50	SIN	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	96 (R)	0,094 (S)	0,87	ADT
1714	32 (R)	0,75 (S)	32 (R)	4 (S)	0,38 (S)	2 (S)	0,50	SIN	0,5 (S)	12 (R)	1,04	IND	0,5 (S)	0,094 (S)	0,69	ADT
1721	32 (R)	4 (S)	0,38 (S)	2 (S)	1,5 (S)	4 (R)	0,50	SIN	1,5 (S)	0,125 (S)	0,70	ADT	1 (S)	0,5 (S)	0,50	SIN
1738	2 (S)	8 (S)	0,032 (S)	1 (S)	4 (S)	0,38 (S)	0,69	ADT	2 (S)	0,016 (S)	0,75	ADT	3 (S)	0,25 (S)	0,63	ADT
1787	12 (R)	4 (S)	12 (R)	0,75 (S)	0,75 (S)	6 (R)	0,69	ADT	0,75 (S)	6 (R)	0,69	ADT	1,5 (S)	0,5 (S)	1,04	IND
1799	48 (R)	8 (S)	32 (R)	0,5 (S)	2 (S)	12 (R)	0,50	SIN	2 (S)	12 (R)	0,63	ADT	2 (S)	0,5 (S)	1,25	IND
1830	64 (R)	4 (S)	32 (R)	4 (S)	1,5 (S)	8 (R)	0,50	SIN	1 (S)	8 (R)	0,50	SIN	1,5 (S)	1 (S)	0,63	ADT
1849	32 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	96 (R)	3 (R)	0,47	SIN	128 (R)	24 (R)	1,25	IND	64 (R)	0,38 (S)	0,63	ADT
1853	16 (R)	8 (S)	3 (R)	4 (S)	8 (S)	16 (R)	2,00	IND	0,5 (S)	0,38 (S)	0,19	SIN	2 (S)	1 (S)	0,50	SIN
2005	0,125 (S)	256 (R)	0,047 (S)	0,38 (S)	64 (R)	0,125 (S)	1,25	IND	24 (I)	0,032 (S)	0,77	ADT	32 (I)	0,094 (S)	0,37	SIN
4182	12 (R)	8 (S)	32 (R)	2 (S)	1,5 (S)	6 (R)	0,69	ADT	2 (S)	12 (R)	0,63	ADT	4 (S)	0,38 (S)	0,69	ADT
4219	8 (R)	3 (S)	32 (R)	1 (S)	0,5 (S)	4 (R)	0,67	ADT	1 (S)	16 (R)	0,83	ADT	1 (S)	0,5 (S)	0,83	ADT
4223	4 (R)	4 (S)	32 (R)	1 (S)	2 (S)	0,75 (S)	0,69	ADT	1 (S)	8 (R)	0,50	SIN	1 (S)	0,5 (S)	0,75	ADT
4224	16 (R)	3 (S)	8 (R)	4 (S)	0,5 (S)	6 (R)	0,50	SIN	0,5 (S)	4 (R)	0,67	ADT	1,5 (S)	1,5 (S)	0,88	ADT
4229	16 (R)	16 (S)	1 (S)	2 (S)	6 (S)	1,5 (S)	0,47	SIN	8 (S)	0,25 (S)	0,75	ADT	6 (S)	0,25 (S)	0,50	SIN
4234	8 (R)	16 (S)	1 (S)	0,75 (S)	3 (S)	3 (R)	0,50	SIN	1,5 (S)	0,38 (S)	0,47	SIN	6 (S)	0,125 (S)	0,54	ADT
4235	12 (R)	2 (S)	32 (R)	1 (S)	0,5 (S)	3 (R)	0,50	SIN	0,5 (S)	4 (R)	0,38	SIN	0,38 (S)	0,25 (S)	0,44	SIN
4281	16 (R)	3 (S)	32 (R)	2 (S)	0,75 (S)	2 (S)	0,38	SIN	0,25 (S)	0,38 (S)	0,10	SIN	0,5 (S)	0,75 (S)	0,54	ADT
4326	48 (R)	3 (S)	32 (R)	4 (S)	1 (S)	6 (R)	0,46	SIN	0,75 (S)	8 (R)	0,50	SIN	0,75 (S)	1,5 (S)	0,63	ADT

4448	12 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	48 (R)	2 (S)	0,35	SIN	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	48 (R)	0,25 (S)	0,44	SIN
4449	12 (R)	2 (S)	32 (R)	2 (S)	0,5 (S)	3 (R)	0,50	SIN	1 (S)	8 (R)	0,75	ADT	0,75 (S)	0,38 (S)	0,57	ADT
4451	24 (R)	2 (S)	0,38 (S)	0,25 (S)	1,5 (S)	6 (R)	1,00	ADT	0,5 (S)	0,125 (S)	0,50	SIN	0,75 (S)	0,125 (S)	0,88	ADT
4477	8 (R)	1,5 (S)	32 (R)	1 (S)	0,38 (S)	6 (R)	1,00	ADT	1 (S)	12 (R)	1,04	IND	0,5 (S)	0,125 (S)	0,46	SIN
4490	32 (R)	256 (R)	32 (R)	0,75 (S)	96 (R)	1 (S)	0,41	SIN	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	48 (R)	0,19 (S)	0,44	SIN
6186	6 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	256 (R)	6 (R)	2,00	IND	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	96 (R)	0,75 (S)	1,13	IND
6189	8 (R)	6 (S)	2 (I)	4 (S)	4 (S)	1,5 (S)	0,85	ADT	4 (S)	0,38 (S)	0,86	ADT	2 (S)	0,75 (S)	0,50	SIN
6193	4 (R)	6 (S)	32 (R)	0,5 (S)	4 (S)	0,75 (S)	0,85	ADT	3 (S)	3 (R)	0,50	SIN	2 (S)	0,125 (S)	0,58	ADT
6208	6 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	64 (R)	4 (R)	0,92	ADT	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	64 (R)	0,5 (S)	0,75	ADT
6358	8 (R)	256 (R)	32 (R)	0,75 (S)	128 (R)	3 (R)	0,88	ADT	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	64 (R)	0,25 (S)	0,58	ADT
4998	2 (S)	12 (S)	32 (R)	2 (S)	2 (S)	0,5 (S)	0,42	SIN	3 (S)	6 (R)	0,44	SIN	3 (S)	0,38 (S)	0,44	SIN
5006	4 (R)	3 (S)	32 (R)	0,75 (S)	1 (S)	0,75 (S)	0,52	ADT	2 (S)	8 (R)	0,92	ADT	1,5 (S)	0,25 (S)	0,83	ADT
4993	12 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	192 (R)	12 (R)	1,75	IND	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	48 (R)	1 (S)	1,19	IND
2162	16 (R)	8 (S)	32 (R)	1 (S)	6 (S)	8 (R)	1,25	IND	4 (S)	32 (R)	1,50	IND	3 (S)	0,25 (S)	0,63	ADT
986	4 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	128 (R)	1,5 (S)	0,88	ADT	3 (S)	6 (R)	0,20	SIN	16 (S)	0,125 (S)	0,19	SIN
4553	6 (R)	256 (R)	32 (R)	1 (S)	192 (R)	0,5 (S)	0,83	IND	3 (S)	8 (R)	0,26	SIN	48 (R)	0,38 (S)	0,57	ADT
4290	4 (R)	12 (S)	32 (R)	2 (S)	4 (S)	0,5 (S)	0,46	SIN	2 (S)	8 (R)	0,42	SIN	8 (S)	0,5 (S)	0,92	ADT
5000	8 (R)	256 (R)	32 (R)	0,75 (S)	96 (R)	1,5 (S)	0,50	SIN	256 (R)	32 (R)	2,00	IND	48 (R)	0,19 (S)	0,44	SIN

Sinergismo %

72,5%

47,5%

40,0%

Legenda: ID, identificação; CIM, concentração inibitória mínima; COMB, combinação antimicrobiana; AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima/avibactam; FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index; SIN, sinergismo; ADT, aditivo; IND, indiferente.

Tabela 3. Resultado do teste de sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de *A. baumannii* (n=20). Combinações apresentando sinergismo estão ressaltadas em verde (AMI+COL), rosa (AMI+MEM) e cinza (AMI+CZA).

ID	CIM (µg/mL)				COMB AMI+COL				COMB AMI+MEM				COMB AMI+CZA			
	COL	AK	CZA	MEM	COL	AK	FICI	Resultado	MEM	AK	FICI	Resultado	CZA	AK	FICI	Resultado
923	0,125 (S)	32 (I)	256 (R)	12 (R)	0,064 (S)	24 (I)	1,26	IND	3 (I)	8 (S)	0,50	SIN	128 (R)	16 (S)	1,00	IND
939	1 (S)	256 (R)	32 (R)	8 (R)	0,5 (S)	48 (R)	0,69	ADT	1(S)	64 (R)	0,38	SIN	12 (S)	32 (I)	0,50	SIN
941	0,38 (S)	32 (I)	256 (R)	16 (R)	0,125 (S)	16 (S)	0,83	ADT	6 (R)	24 (I)	1,13	IND	64 (R)	16 (S)	0,75	ADT
994	1,5 (S)	32 (I)	256 (R)	32 (R)	0,25 (S)	8 (S)	0,42	SIN	12 (R)	24 (I)	1,13	IND	64 (R)	32 (I)	1,25	IND
997	2 (S)	256 (R)	256 (R)	32 (R)	0,38 (S)	96 (R)	0,57	ADT	16 (R)	192 (R)	1,25	IND	64 (R)	96 (R)	0,63	ADT
1011	256 (R)	256 (R)	256 (R)	24 (R)	32 (R)	128 (R)	0,63	ADT	12 (R)	192 (R)	1,25	IND	96 (R)	128 (R)	0,88	ADT
1013	1,5 (S)	256 (R)	256 (R)	32 (R)	0,38 (S)	96 (R)	0,63	ADT	32 (R)	256 (R)	2,00	IND	128 (R)	64 (R)	0,75	ADT
1018	256 (R)	64 (R)	256 (R)	24 (R)	24 (R)	16 (S)	0,34	SIN	8 (R)	48 (R)	1,08	IND	64 (R)	12 (S)	0,44	SIN
1029	256 (R)	256 (R)	256 (R)	16 (R)	32 (R)	48 (R)	0,31	SIN	6 (R)	128 (R)	0,88	ADT	48 (R)	64 (R)	0,44	SIN
1049	256 (R)	256 (R)	32 (R)	16 (R)	4 (R)	48 (R)	0,20	SIN	8 (R)	256 (R)	1,50	IND	12 (S)	32 (I)	0,50	SIN
1099	12 (R)	96 (R)	32 (R)	16 (R)	3 (R)	12 (S)	0,38	SIN	4 (I)	32 (R)	0,58	ADT	3 (S)	16 (S)	0,26	SIN
1126	256 (R)	256 (R)	256 (R)	24 (R)	8 (R)	96 (R)	0,41	SIN	24 (R)	192 (R)	1,75	IND	32 (R)	96 (R)	0,50	SIN
1128	16 (R)	192 (R)	256 (R)	32 (R)	3 (R)	48 (R)	0,44	SIN	16 (R)	24 (I)	0,63	ADT	96 (R)	48 (R)	0,63	ADT
1132	256 (R)	3 (S)	32 (R)	6 (R)	48 (R)	0,75 (S)	0,44	SIN	1 (S)	2 (S)	0,83	ADT	4 (S)	0,75 (S)	0,38	SIN
1819	0,25 (S)	48 (R)	48 (R)	32 (R)	0,064 (S)	12 (S)	0,51	SIN	6 (R)	8 (S)	0,35	SIN	12 (S)	8 (S)	0,42	SIN
6096	0,25 (S)	32 (I)	64 (R)	24 (R)	0,125 (S)	16 (S)	1,00	IND	8 (R)	16 (S)	0,83	ADT	16 (R)	12 (S)	0,63	ADT
6196	2 (S)	32 (I)	24 (R)	32 (R)	0,5 (S)	16 (S)	0,75	ADT	8 (R)	8 (S)	0,50	SIN	6 (S)	12 (S)	0,63	ADT
6197	2 (S)	24 (I)	24 (R)	16 (R)	0,5 (S)	12 (S)	0,75	ADT	3 (I)	6 (S)	0,44	SIN	4 (S)	16 (S)	0,83	ADT
6212	0,25 (S)	256 (R)	16 (R)	32 (R)	0,19 (S)	256 (R)	1,76	IND	32 (R)	256 (R)	2,00	IND	8 (S)	96 (R)	0,88	ADT
6418	0,19 (S)	16 (S)	256 (R)	12 (R)	0,064 (S)	8 (S)	0,50	SIN	4 (I)	8 (S)	0,83	SIN	64 (R)	8 (S)	0,50	SIN
Sinergismo (%)					50%				45%				25%			

ID, identificação; CIM, concentração inibitória mínima; COMB, combinação antimicrobiana; AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima/avibactam; FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index; SIN, sinergismo; ADT, aditivo; IND, indiferente.

Tabela 4. Resultado do sinergismo pelo método Epsilométrico nas combinações avaliadas nos isolados de *S. marcescens* (n=12). Combinações apresentando sinergismo estão ressaltadas em verde (AMI+COL), rosa (AMI+MEM) e cinza (AMI+CZA).

ID	CIM (µg/mL)				COMB AMI+COL				COMB AMI+MEM				COMB AMI+CZA			
	COL	AK	MEM	CZA	AK	COL	FICI	Resultado	AK	MEM	FICI	Resultado	AK	CZA	FICI	Resultado
630	0,5 (S)	24 (I)	32 (R)	0,50 (S)	16 (S)	0,25 (R)	1,17	IND	16 (S)	8 (R)	0,92	ADT	6 (S)	0,125 (S)	0,50	SIN
642	256 (R)	32 (I)	32 (R)	0,50 (S)	32 (I)	256 (R)	2,00	IND	16 (S)	12 (R)	0,88	ADT	12 (S)	0,19 (S)	0,76	ADT
1052	256 (R)	128 (R)	4 (R)	1,00 (S)	48 (R)	4 (R)	0,39	SIN	48 (R)	0,5 (S)	0,50	SIN	48 (R)	0,019 (S)	0,39	SIN
1058	256 (R)	256 (R)	0,125 (S)	0,75 (S)	96 (R)	2 (R)	0,38	SIN	48 (R)	0,032 (S)	0,44	SIN	48 (R)	0,125 (S)	0,35	SIN
1309	256 (R)	32 (I)	32 (R)	0,50 (S)	32 (I)	256 (R)	2,00	IND	32 (I)	12 (R)	1,38	IND	8 (S)	0,19 (S)	0,63	ADT
1510	256 (R)	12 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	8 (S)	192 (R)	1,42	IND	3 (S)	0,064 (S)	0,50	SIN	3 (S)	0,032 (S)	0,50	SIN
1756	256 (R)	6 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	6 (S)	256 (R)	2,00	IND	2 (S)	0,094 (S)	0,71	ADT	1,5 (S)	0,047 (S)	0,63	ADT
1763	256 (R)	8 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	1 (S)	4 (R)	0,14	SIN	2 (S)	0,125 (S)	0,50	SIN	2 (S)	0,125 (S)	0,75	ADT
5880	256 (R)	3 (S)	32 (R)	0,38 (S)	3 (S)	256 (R)	2,00	IND	3 (S)	16 (R)	1,50	IND	1 (S)	0,125 (S)	0,66	ADT
5932	256 (R)	16 (S)	12 (R)	0,125 (S)	3 (S)	64 (R)	0,44	SIN	3 (S)	8 (R)	0,85	ADT	4 (S)	0,032 (S)	0,50	SIN
6217	256 (R)	24 (I)	32 (R)	0,38 (S)	24 (I)	256 (R)	2,00	IND	16 (S)	8 (R)	0,92	ADT	6 (S)	0,19 (S)	0,75	ADT
6218	256 (R)	32 (I)	32 (R)	0,50 (S)	32 (R)	256 (R)	2,00	IND	32 (I)	12 (R)	1,38	IND	6 (S)	0,125 (S)	0,44	SIN
<b>Sinergismo (%)</b>					33,3%				33,3%				50%			

ID, identificação; CIM, concentração inibitória mínima; COMB, combinação antimicrobiana; AK, ampicilina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima/avibactam; FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index; SIN, sinergismo; ADT, aditivo.

Os resultados obtidos pelo método epsilométrico estão ilustrados na Figura 10.

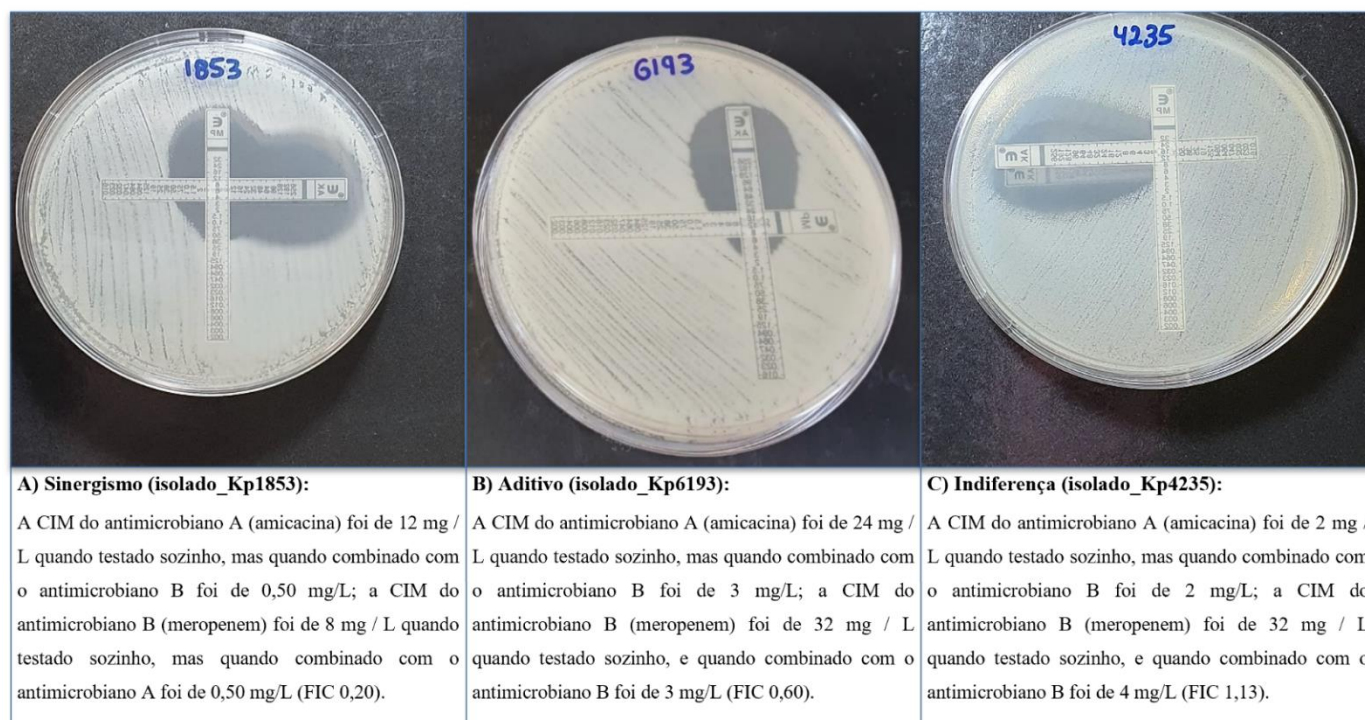


Figura 9. Ensaio do teste epsilométrico nas combinações antimicrobianas nos isolados de *K. pneumoniae*. Legenda: A) Imagem do resultado representativo de sinergismo (FICI  $\leq 0,5$ ), B) Resultado representativo de aditivo (FICI  $>0,5$  e  $<1$ ) e C) Resultado representativo de indiferença (FICI  $\geq 1$  e  $\leq 4$ ).

O efeito antimicrobiano da amicacina em combinação com outras drogas variou entre microrganismos e compostos testados. Os valores de FICI indicaram um efeito sinérgico em todas as combinações, porém, a combinação AMI+MEM apresentou maior efeito aditivo, com alguns valores de isolados mostrando um efeito indiferente. Já na combinação AMI+COL, houve um maior efeito indiferente em cepas de *S. marcescens*. Na combinação AMI+CZA, todos os isolados apresentaram efeitos sinérgicos e aditivos, como demonstrado na Figura 11.

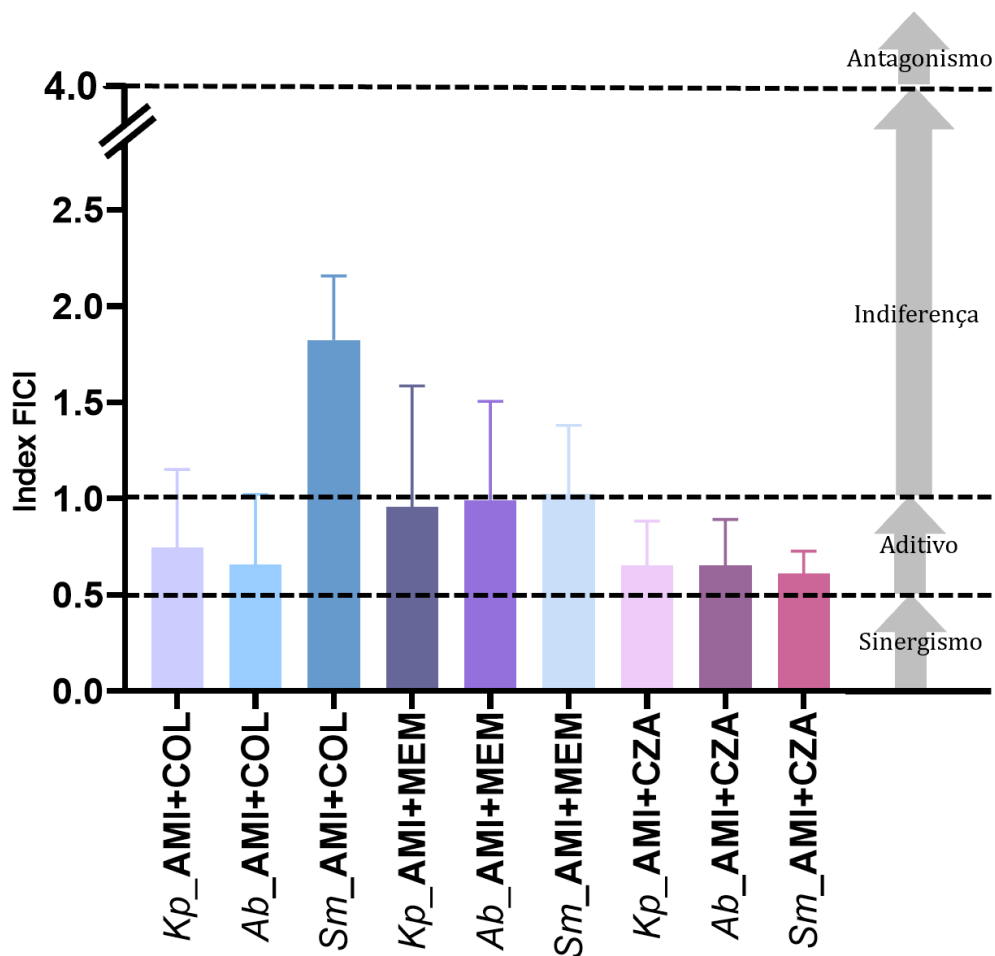


Figura 10. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) da amicacina combinada com colistina, meropenem e ceftazidima-avibactam em isolados de *K. pneumoniae* (Kp), *A. baumannii* (Ab) e *S. marcescens* (Sm): análise de efeito sinérgico, aditivo e indiferente. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos valores.

#### 5.2.1.1 Variação na redução da concentração inibitória mínima da amicacina quando combinada com os outros antibióticos

Os resultados da análise de variação indicaram que a redução na CIM da AK quando combinada com COL, apresentou uma variação menor nos isolados de *K. pneumoniae* (2,36) e *A. baumannii* (2,34), porém maior nos isolados de *S. marcescens* (4,63). Na combinação com MEM, observou-se uma variação menor na redução da CIM da AK nos isolados de *A. baumannii* (3,19) e *S. marcescens* (3,30), enquanto a variação foi maior nos isolados de *K. pneumoniae* (9,24). Por fim, na combinação de AK com CZA, a redução da CIM da AK mostrou uma variação menor nos isolados de *S. marcescens* (0,36), seguida de *K. pneumoniae* (1,42) e *A. baumannii* (2,56) (Tabela 5).

Tabela 5. Tabela de variação na redução da CIM da amicacina em combinação com diferentes antibióticos nos isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens*

		Desvio padrão	Média	Variância	Coefficiente de variação (%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=40)	COL	2,95	1,54	2,36	52%
	MEM	3,20	3,04	9,24	95%
	CZA	3,63	1,19	1,42	33%
<i>A. baumannii</i> (n=20)	COL	3,15	1,53	2,34	49%
	MEM	2,15	1,79	3,19	83%
	CZA	3,35	1,60	2,56	48%
<i>S. marcescens</i> (n=12)	COL	1,58	2,15	4,63	136%
	MEM	2,25	1,82	3,30	81%
	CZA	4,00	0,60	0,36	15%

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; AMI, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima-avibactam.

### 5.2.2 Determinação de sinergismo pelo método de disco aproximação

Foram analisadas as combinações entre AK com COL, AK com MEM, AK com CZA, GEN com COL, GEN com MEM e GEN com CZA.

Nos isolados de *K. pneumoniae* foi observado efeito sinérgico em 77,5% (31/40) das amostras na combinação de AK com COL, 37,5% (15/40) entre AK com MEM, 37,5% (15/40) entre AK com CZA, 30% (12/40) entre GEN com COL, 17,5% (7/40) entre GEN com MEM e 25,0% (10/40) entre GEN com CZA (Figura 12).

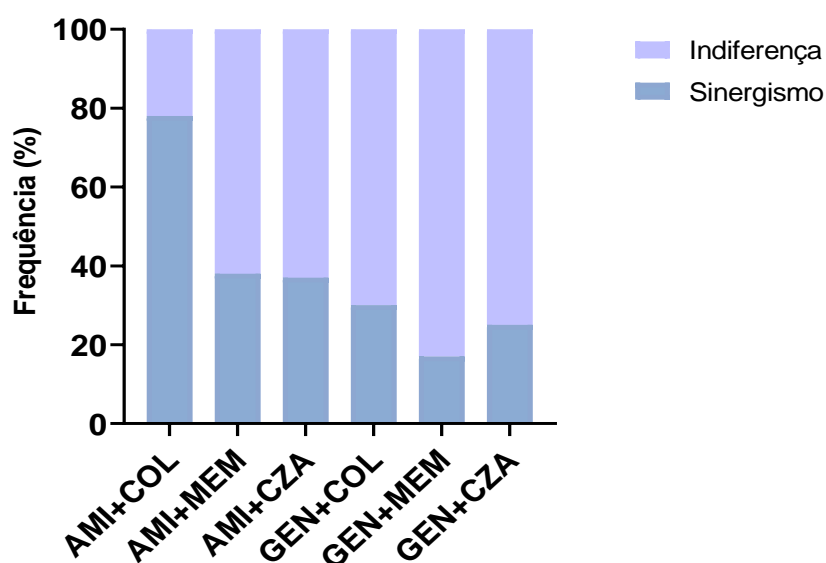




Figura 11. Frequência de sinergismo antibiótico pelo método de disco aproximação nos isolados de *K. pneumoniae* (n=40).

Nos isolados de *A. baumannii* foi observado 35% (7/20) de efeito sinérgico na combinação de AK com COL, 20% (4/20) entre AK com MEM, 55% (11/20) entre AK com CZA, 25% (5/20) entre GEN com COL, 20% (4/20) entre GEN com MEM e 45% (9/20) entre GEN com CZA (Figura 13).

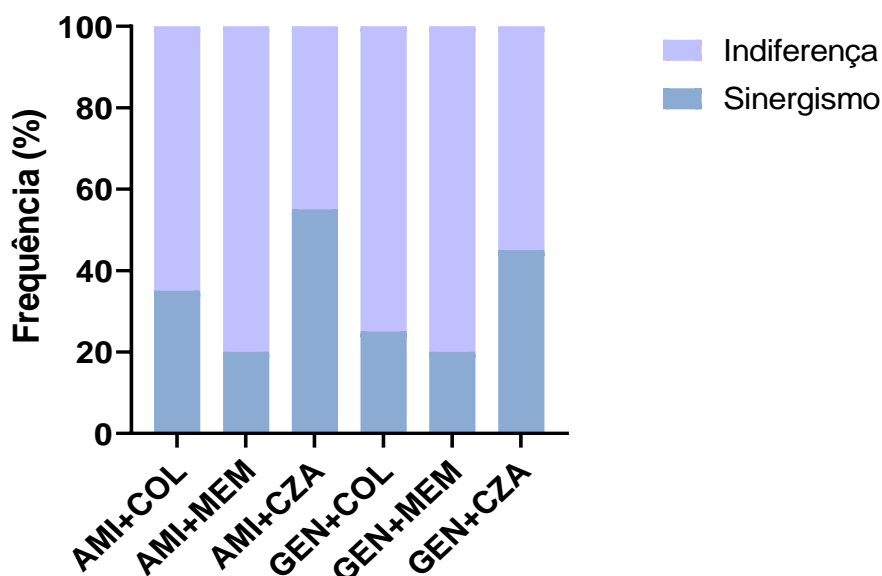


Figura 12. Frequência de sinergismo antibiótico pelo método de disco aproximação nos isolados de *A. baumannii* (n=20).

Nos isolados de *S. marcescens* foi observado 25% (3/12) de efeito sinérgico nas combinações de AK com COL, 17% (2/12) entre AK com MEM, 58% (7/12) entre AK com CZA, 25% (3/12) entre GEN com COL, 25% (3/12) entre GEN com MEM e 33% (4/12) entre GEN com CZA. Nesses isolados foi observado efeito antagônico em 17% (2/12) das combinações de amicacina com colistina e 25% (3/12) entre gentamicina com colistina (Figura 14).

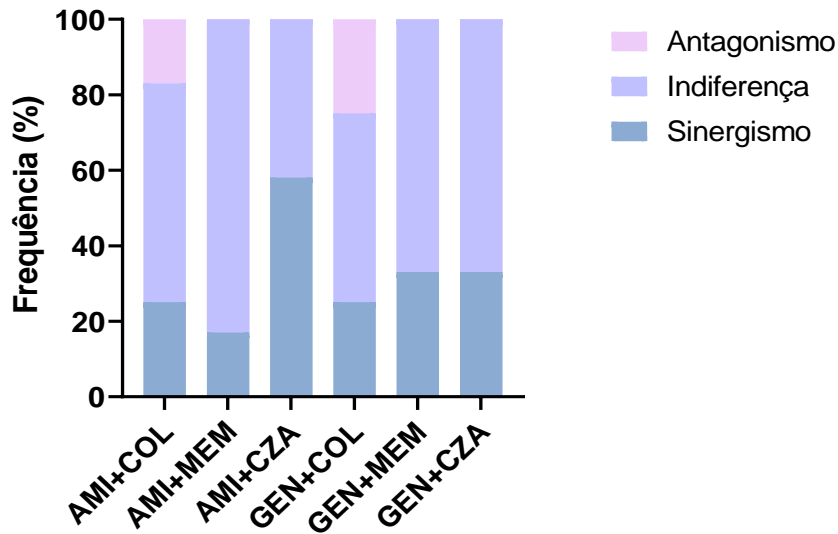


Figura 13. Frequência de sinergismo pelo método de disco aproximação nos isolados de *S. marcescens* (n=12).

A interpretação dos testes de disco aproximação foi realizada observando as zonas de inibição. Na figura 16, é possível visualizar um exemplo dos resultados obtidos. Em interações sinérgicas foi observada uma ponte próxima da junção das duas zonas de inibição (Figura 15A); em interações antagônicas é observada uma distorção próxima às duas zonas de inibição (Figura 15C) e em combinações indiferentes são observados dois halos independentes (Figura 15B).

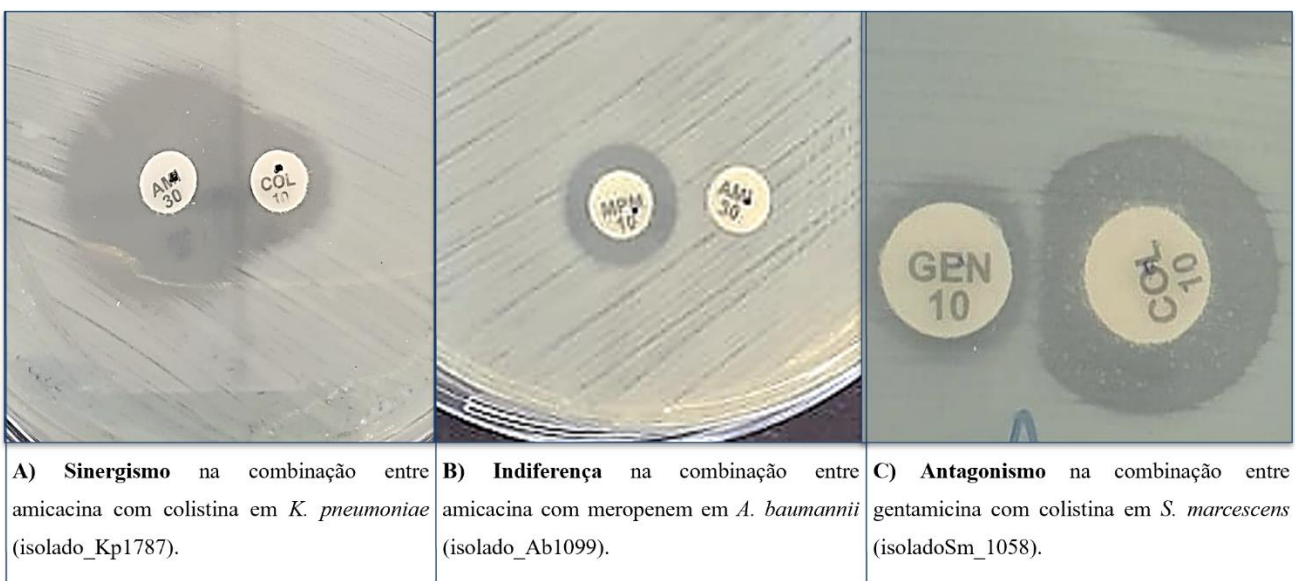


Figura 14. Resultados representativos dos efeitos encontrados no método de disco aproximação.

### 5.3 Análise de concordância entre métodos de sinergismo *in vitro*

A análise de concordância entre os métodos de disco aproximação e Epsilométrico nos isolados de *K. pneumoniae* evidenciou uma concordância muito boa para as combinações de AK com COL ( $k=0,86$ ) e AK com CZA ( $k=0,94$ ) e concordância boa ( $k=0,69$ ) na combinação de AK com MEM (Tabela 6). Pelos métodos de E-test e disco aproximação, os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram efeito sinérgico na combinação de AK com COL de 72,57% e 77,5%. Já na combinação de AK com MEM o efeito sinérgico foi de 47,5% e 37,5% e, na combinação de AK com CZA o efeito sinérgico foi de 40% e 37,5%, respectivamente. Não foi observado o efeito de antagonismo nessas combinações.

Nos isolados de *A. baumannii* se evidenciou uma concordância muito boa para as combinações de AK com COL ( $k=0,70$ ) e AK com CZA ( $k=0,79$ ) e concordância boa ( $k=0,47$ ) na combinação de AK com MEM (tabela 7). Um efeito sinérgico de 45,0% e 35,0% foi verificado nas combinações de AK com COL pelos métodos E-test e disco aproximação, respectivamente. Na combinação de AK com MEM se observou 25,0% e 20,0% de efeito sinérgico pelos métodos E-test e disco aproximação, respectivamente e, a combinação de AK com CZA exibiram 45% e 55% de efeito sinérgico pelo método E-test e disco aproximação, respectivamente. Não foi observado efeito de antagonismo nessas combinações.

Os isolados de *S. marcescens* evidenciaram uma concordância boa para as combinações de AK com COL ( $k=0,80$ ), AK com MEM ( $k=0,57$ ), AK com CZA ( $k=0,63$ ) (tabela 7). Na combinação de AK com COL se observou 33% e 17% de efeito sinérgico pelo método E-test e disco aproximação, respectivamente. O efeito antagônico foi de 17% (2/12) apenas observado pelo método de disco aproximação. Foi observado 33% e 17% de efeito sinérgico na combinação de AK com MEM pelos métodos E-test e disco aproximação, respectivamente. Na combinação de AK com CZA se observou 50% e 58% de efeito sinérgico pelo método E-test e disco aproximação, respectivamente.

Tabela 6. Análise de concordância entre o disco aproximação e ensaio E-test de acordo com as combinações antimicrobianas testadas.

Combinações/espécies	Disco aproximação / Epsilométrico	
<b><i>K. pneumoniae</i> (n= 40)</b>	<b>Concordância (%)</b>	<b>Kappa/ valor de p</b>
AK + COL	95,0 %	0,867 / < 0,001
AK + MEM	85,0 %	0,696 / < 0,001
AK + CZA	97,5 %	0,947 / < 0,001
<b><i>A. baumannii</i> (n= 20)</b>		
AK + COL	85,0 %	0,700 / < 0,001
AK + MEM	62,0%	0,474 / < 0,001
AK + CZA	90,0 %	0,791 / < 0,001
<b><i>S. marcescens</i> (n= 12)</b>		
AK + COL	92,0 %	0,800 / < 0,001
AK + MEM	83,3%	0,571 / < 0,001
AK + CZA	84,1%	0,636 / < 0,001

Legenda: AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima/avibactam.

Os isolados que apresentaram resultados discordantes entre os métodos de disco aproximação e teste epsilométrico foram confirmados usando o método considerado padrão ouro (*Time-Kill*). Observou-se que, nas combinações envolvendo *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens*, houve 12/40 (30%), 9/20 (45%) e 7/12 (58%) de isolados discordantes, respectivamente. Todos os isolados discordantes foram submetidos ao método padrão ouro para confirmação. Comparando os dois métodos, o teste epsilométrico apresentou uma maior concordância em relação ao método de disco aproximação. Além disso, os resultados de antagonismo observados pelo método de disco aproximação não foram evidenciados pelo *Time-Kill*. A figura 16 (A-C) ilustra alguns dos experimentos realizados com os isolados que apresentaram discordâncias.

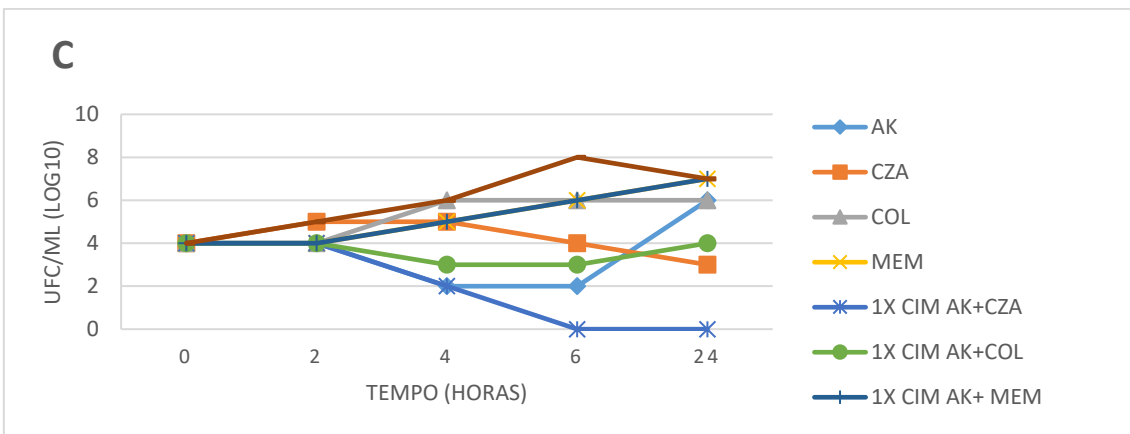
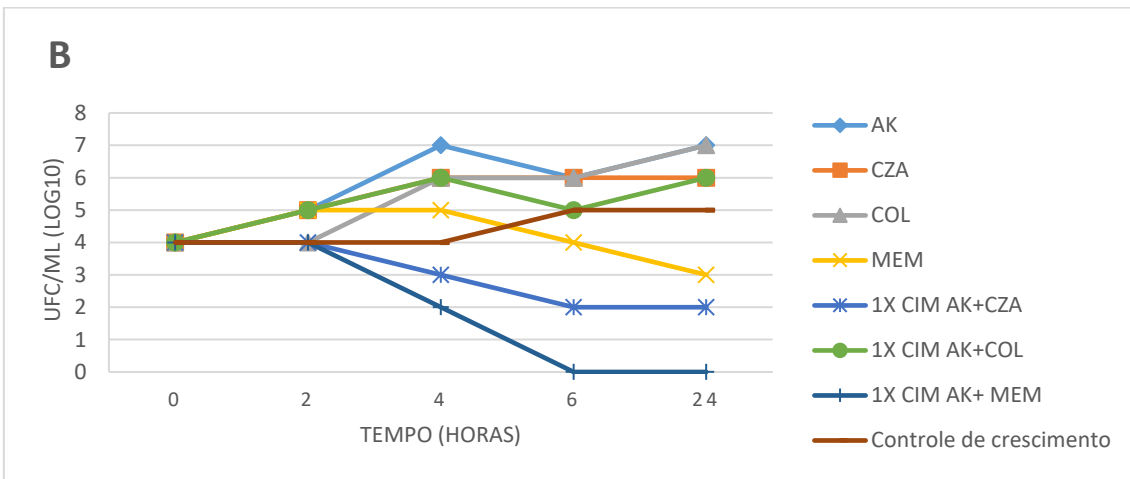
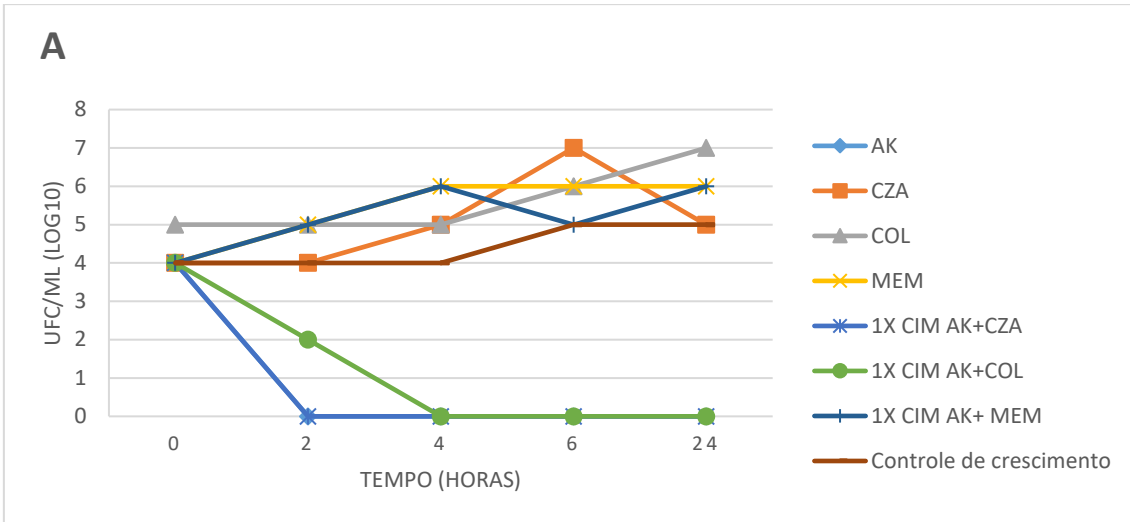


Figura 15. Representação da dinâmica de crescimento em função do tempo das diferentes combinações de antimicrobianos. **A)** *K. pneumoniae* (isolado\_Kp1787), **B)** *A. baumannii* (isolado\_Ab986) e **C)** *S. marcescens* (isolado\_Sm1058)

Os tipos de erros encontrados entre os métodos de disco aproximação e E-test para as combinações testadas nos isolados do estudo são apresentados na tabela 7. Foi observado 5% de erro menor na combinação de AK com COL e 2,5% de erro menor na combinação de AK com CZA nos isolados de *K. pneumoniae*. Nos isolados de *A. baumannii* observou-se um percentual de 20%, 15% e 10% de erro menor nas combinações de AK com MEM, AK com COL e AK com CZA, respectivamente. Nos isolados de *S. marcescens* foram observados 16,6% de erros menores nas combinações de AK com MEM e AK com CZA, e 8% de erro grave na combinação de AK com COL.

Tabela 7. Tipos de erros encontrados nas combinações avaliadas de acordo com os métodos de disco aproximação e Epsilométrico

Métodos Combinações	Disco aproximação e Epsilométrico		
	MG (%)	G (%)	M (%)
<b><i>K. pneumoniae</i> (n=40)</b>			
AMI+COL	-	-	2 (5)
AMI+MEM	-	-	6 (15)
AMI+CZA	-	-	1 (2,5)
<b><i>A. baumannii</i> (n=20)</b>			
AMI+COL	-	-	3 (15)
AMI+MEM	-	-	4 (20)
AMI+CZA	-	-	2 (10)
<b><i>S. marcescens</i> (n=12)</b>			
AMI+COL	-	1(8)	-
AMI+MEM	-	-	2 (16,6)
AMI+CZA	-	-	2 (16,6)

Legenda: AMI, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima-avibactam; MG, muito grave; G, grave; M, menor; -, ausência.

#### 5.4 Sinergismo *in vitro* e perfil de sensibilidade dos isolados

O perfil de sensibilidade dos isolados foi associado com o resultado dos testes de sinergismo antimicrobiano do total de isolados e por cada espécie/combinação. Em geral, foram feitas 120 combinações nos isolados de *K. pneumoniae*, 60 combinações em *A. baumannii* e 24 combinações em *S. marcescens*. O efeito sinérgico foi observado em 163 combinações, das quais 131 apresentaram sensibilidade a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Diante disso, o teste qui-quadrado mostrou associação entre a sensibilidade a um dos antimicrobianos testados e a presença do efeito sinérgico, com o valor  $p < 0,05$  (tabela 8).

Tabela 8. Associação entre o perfil de sensibilidade e a presença do sinergismo antimicrobiano em todas as combinações testadas.

Todas as combinações	Sensibilidade ATB			Valor- <i>p</i>
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
<b>Sinergismo</b>	131	32	163	< 0,001
<b>Indiferença</b>	15	26	41	
<b>Total</b>	146	58	204	

S: sensível, R: resistente, ATB: antibiótico.

Dos isolados de *K. pneumoniae* 90% (36/40) foram sensíveis a um dos antimicrobianos testados na combinação de AK com COL e 10% (4/40) dos isolados foram resistentes aos dois antimicrobianos. Na combinação entre AK com CZA, 100% (40/40) dos isolados apresentaram sensibilidade em um dos antimicrobianos e nenhum dos isolados apresentou resistência aos dois antimicrobianos. Portanto, nessas associações não se estabeleceu associação entre os resultados de sinergismo e o perfil de sensibilidade ( $p > 0,05$ ). Apenas na combinação entre AK com MEM se estabeleceu associação ( $p < 0,05$ ) entre a presença de sinergismo antimicrobiano e o padrão de sensibilidade a AK na qual 75% (30/40) foram sensíveis a um dos antimicrobianos testados, entretanto 25% (10/40) foram resistentes aos dois antimicrobianos, como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Relação entre a interação de amicacina com os outros antibióticos e o perfil de sensibilidade em *K. pneumoniae*.

AK+COL	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	20	1	21	0,16
Aditivo	12	1	13	
Indiferente	4	2	6	
Antagonismo	0	0	0	
Total	36	4	40	
AK+MEM	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	14	0	14	0,039*
Aditivo	13	0	13	
Indiferente	3	10	13	
Antagonismo	0	0	0	
Total	30	10	40	
AK+CZA	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	13	0	13	0,14
Aditivo	23	0	23	
Indiferente	4	0	4	
Antagonismo	0	0	0	
Total	40	0	40	

Legenda: \* Significativo ( $p < 0,05$ ), AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima-avibactam; S: sensível, R: resistente, ATB: antibiótico.

Dos isolados de *A. baumannii*, 40% (9/20) foram sensíveis a um dos antimicrobianos testados nas combinações de AK com COL e AK com MEM, entretanto 60% (12/20) dos isolados foram resistentes aos dois antimicrobianos. Na combinação entre AK com CZA, 45% (9/20) dos isolados apresentaram sensibilidade a um dos antimicrobianos e 55% (11/20) apresentaram resistência aos dois antimicrobianos. Nesses grupos, obtivemos duas associações significativas, na combinação entre AK com COL, na qual o padrão de resistência a colistina apresentou associação com a presença de sinergismo, e na combinação entre AK com CZA, na qual o padrão de resistência a AK teve associação com os resultados de sinergismo dessa combinação ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).



**Tabela 10.** Relação entre a interação de amicacina com os outros antibióticos e o perfil de sensibilidade em *A. baumannii*.

AK+COL	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	2	7	9	0,012*
Aditivo	3	5	8	
Indiferente	3	0	3	
Antagonismo	0	0	0	
Total	8	12	20	
AK+MEM	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	5	0	5	0,193
Aditivo	3	3	6	
Indiferente	0	9	9	
Antagonismo	0	0	0	
Total	8	12	20	
AK+CZA	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	5	4	9	0,035*
Aditivo	4	5	9	
Indiferente	0	2	2	
Antagonismo	0	0	0	
Total	9	11	20	

Legenda: \* Significativo ( $p < 0,05$ ), AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima-avibactam; S: sensível, R: resistente, ATB: antibiótico.

Dos isolados de *S. marcescens*, 75% (7/12) foram sensíveis a um dos antimicrobianos testados na combinação de AK com MEM e 25% (5/12) foram resistentes aos dois antimicrobianos. Houve associação entre o resultado de sinergismo e o padrão de sensibilidade a MEM dessa combinação antimicrobiana ( $p < 0,05$ ). Na combinação entre AK com CZA, 100% (12/12) dos isolados apresentaram sensibilidade a um dos antimicrobianos e nenhum dos isolados apresentou resistência aos dois antimicrobianos testados (Tabela 11). Portanto, não se estabeleceu diferença significativa nessa combinação avaliada.

**Tabela 11.** Relação entre o resultado da interação entre amicacina com meropenem com o perfil de sensibilidade em *S. marcescens*.

AK+COL	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	2	2	4	0,092
Aditivo	0	0	0	
Indiferente	4	4	8	
Antagonismo	0	0	0	
Total	6	6	12	
AK+MEM	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	3	1	4	0,023*
Aditivo	1	4	5	
Indiferente	1	2	3	
Antagonismo	0	0	0	
Total	5	7	12	
AK+CZA	Sensibilidade antimicrobiana			Valor-p
	S – 1 ATB	R – 2 ATB	Total	
Sinergismo	4	2	6	0,610
Aditivo	4	2	6	
Indiferente	0	0	0	
Antagonismo	0	0	0	
Total	8	4	12	

Legenda: \* Significativo (p<0,05), AK, amicacina; COL, colistina; MEM, meropenem; CZA, ceftazidima-avibactam; S: sensível, R: resistente, ATB: antibiótico.

### 5.5 Caracterização dos principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

Na avaliação das bombas de efluxo foram identificados 17 genes pertencentes as famílias: ABC, MFS e RND nos isolados de *K. pneumoniae*. Nos isolados de *A. baumannii* foram identificados 16 genes que codificam genes pertencentes as 4 famílias: MATE, SMR, RND e MFS. Nos isolados de *S. marcescens* foram identificados 3 genes das MFS e RND.

Na avaliação das proteínas de membrana externa foram identificados os genes codificadores das porinas ompK35, ompK36 e ompK37 nos isolados de *K. pneumoniae*. 37% das porinas ompK35 apresentaram mutações sinônimas, 28% de inserção (V40\_G41insMEKWS) e 5% de deleção (Q288del), as porinas ompK36 apresentaram 100% de mutações sinônimas, 15% deleção e inserção (A183\_T184insLSP, T222L, Y260del), e as porinas ompK37 apresentaram 68% de mutações não sinônimas, 20% de inserção (M233\_T234insHYTH) e 4% de deleção (M233\_G240del).

As porinas *ompA*, *carO* e *oprD* foram identificadas nos isolados de *A. baumannii*. 75% dos isolados carregam as porinas *ompA*, dentre eles, 100% apresentaram ao menos uma mutação sinônima. 90% dos isolados carregam as porinas *carO* e *oprD*, dentre eles, 33% e 42% tinham ao menos uma mutação sinônima, respectivamente.

As porinas *ompC* e *ompF* foram identificadas nos isolados de *S. marcescens*. Nas porinas *ompC* 100% das mutações foram sinônimas e nas porinas *ompF* 100% das mutações foram não sinônimas, 80% dos isolados mostraram deleção (267DEL\_NTCAATENCGG\_277) e 20% de inserção (311ins\_AGR\_312).

Finalmente, no mecanismo de resistência enzimático se observaram os genes de resistência aos carbapenêmicos, como *blaKPC-2* (86%), *blaOXA-23* (80%), e outros mecanismos, como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs; 98%).

Nos isolados de *K. pneumoniae* foram encontrados genes de resistência mediados pelas EMAs e pela produção de uma metilase de rRNA 16S: *aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Via*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ic*, *aac(6')Ib-cr*, *aac(3)-IId*, *aac(6')-IId*, *strA*, *strB*, *rtmG* e *rtmB*. Alguns isolados apresentaram mutações do tipo deletérias nos genes *aadA1* e *aph(3')-Via*. No entanto, a maior porcentagem dos isolados expressaram mutações sinônimas (substituição de bases). Destaca-se que os genes de resistência tais como *aac(6')-IId*, *aac(3)-IId* e as metilases *rtmG* e *rtmB* não mostraram nenhuma mutação nos genomas bacterianos das cepas de *K. pneumoniae* (Figura 17).

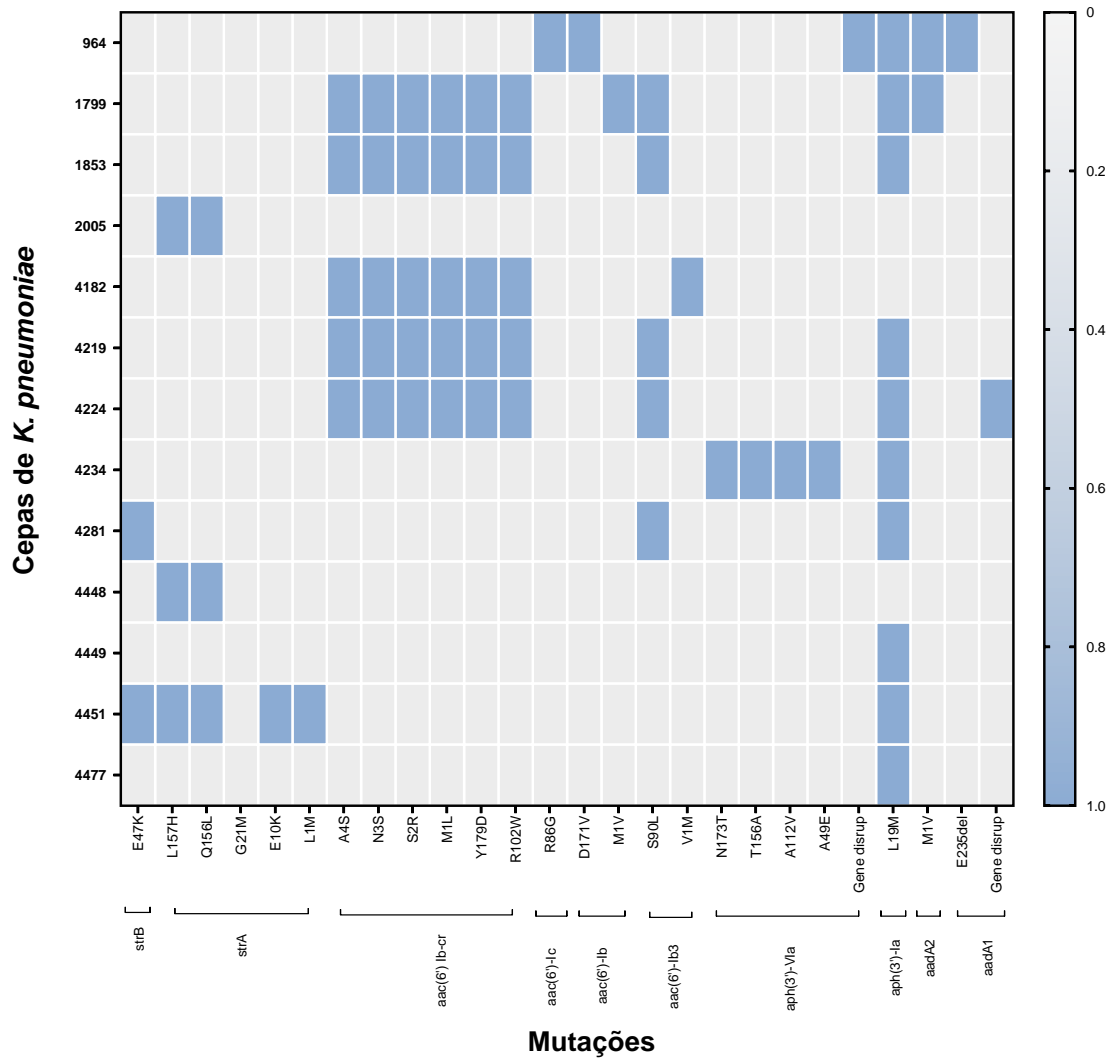


Figura 16. Representação dos genes de resistência e suas mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em *K. pneumoniae*.

Nos isolados de *A. baumannii* foram encontrados genes de resistência aos aminoglicosídeos por modificação enzimática, mediada por três classes de enzimas, aqueles genes de subclasse *aadA1*, *aadA2*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Via*, *strA* e *strB*. Os isolados que expressaram mutações nos genes de resistência *strB* e *aadA1* foram classificados como deletérias (Figura 18).

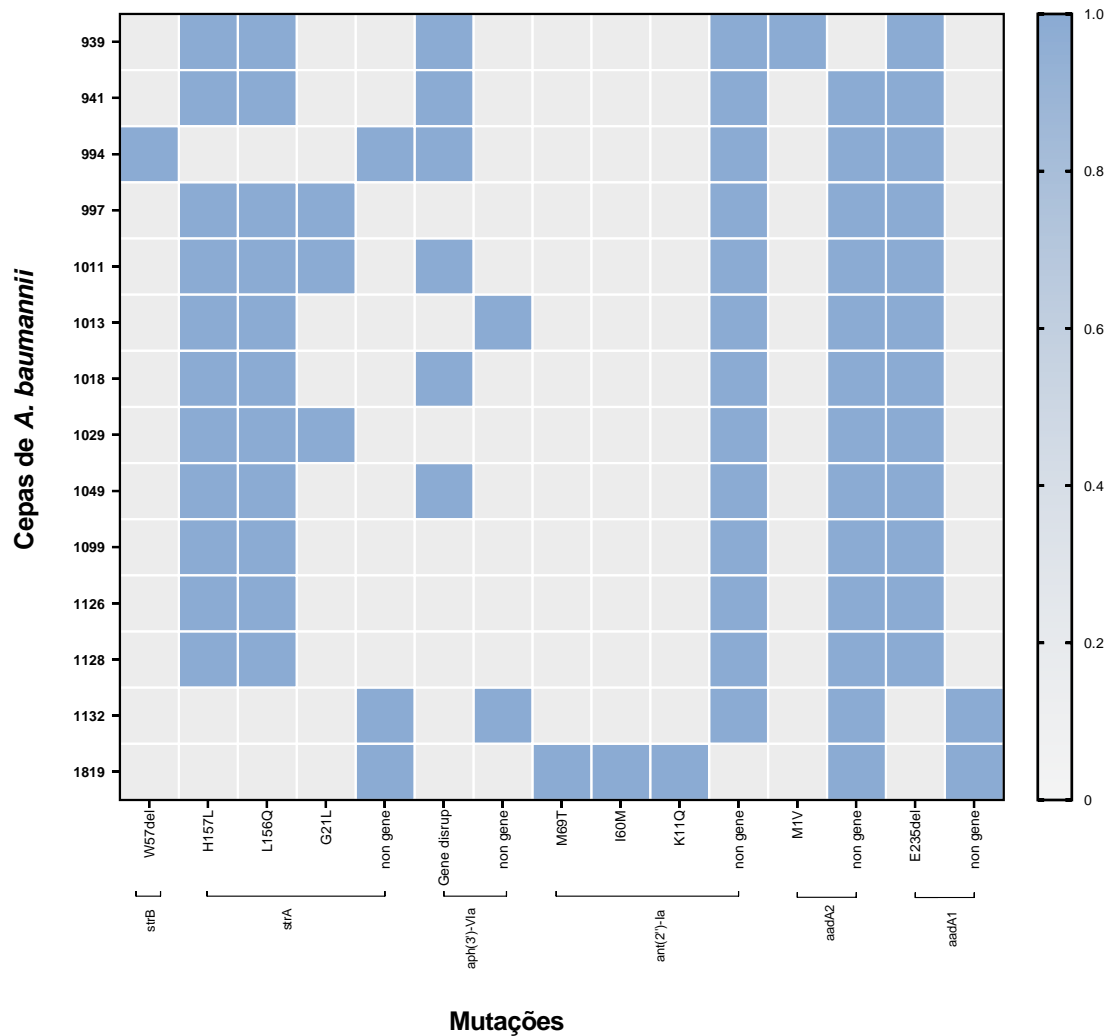


Figura 17. Representação dos genes de resistência e as mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii*.

Nos isolados de *S. marcescens* também foram encontrados genes de resistência mediada pelas EMAs, entre eles os genes de subclasse *aadA6*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Via*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ic*, *aac(6')Ib-cr* e *aac(6')-IId*. A maioria dos genes de resistência apresentaram mutações neutras. Entretanto, os genes *aadA6*, *aph(3')-Via*, *aac(6')-Ib3* apresentaram mutações deletérias. Além disso, os genes *aac(6')-Ib* e *aac(6')-IId* não apresentaram mutações nesses isolados (Figura 19).

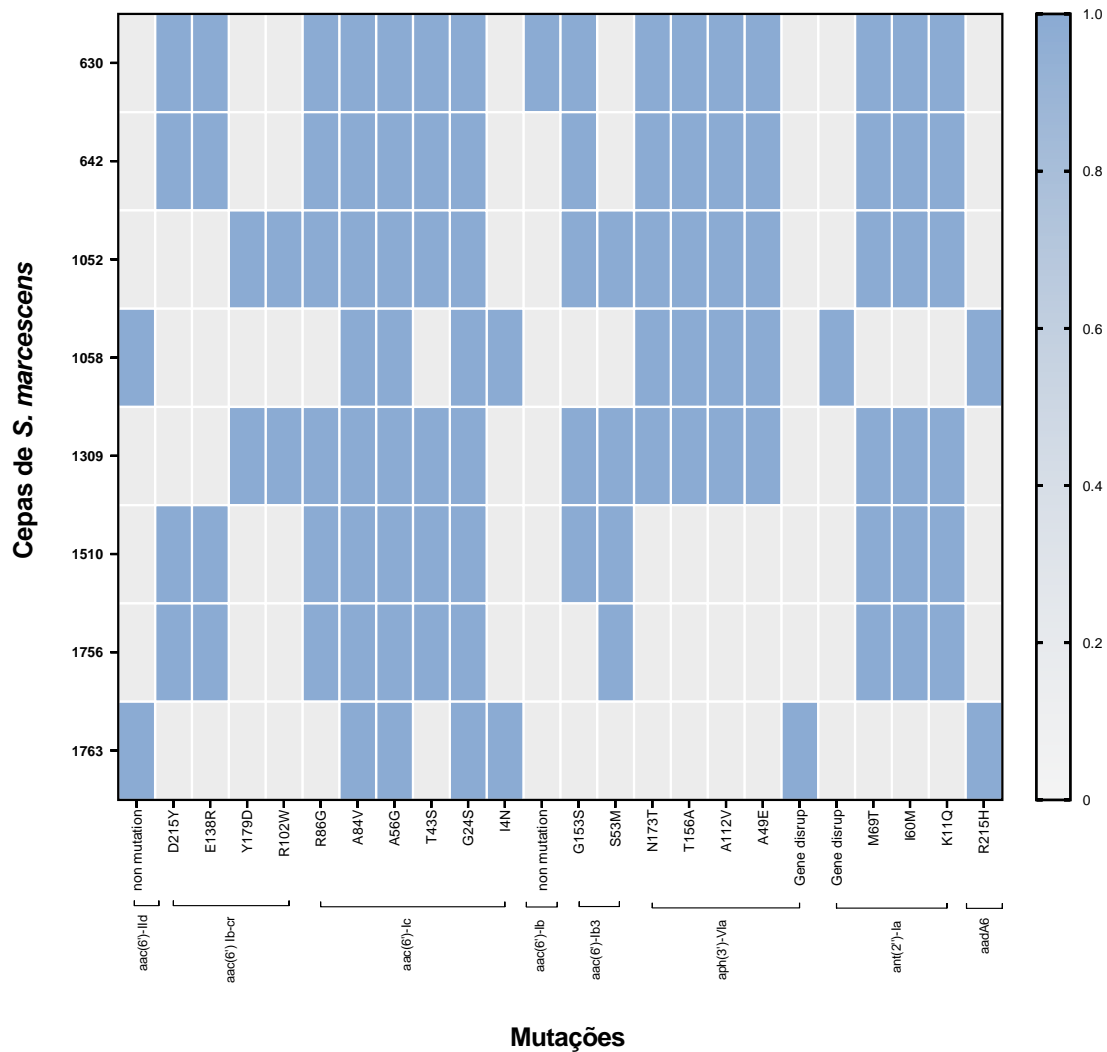


Figura 18. Representação dos genes de resistência e as mutações envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos em *S. marcescens*.

Os genes de resistência aos aminoglicosídeos foram encontrados em elementos genéticos moveis ou no cromossomo bacteriano e estão apresentados na tabela 18. Em *K. pneumoniae*, foram observados em maior frequência os plasmídeos do grupo IncF, principalmente o IncFIB(K) e IncFII(K) em 96% e 85%, respectivamente. Ao contrário de *S. marcescens*, o plasmídeo da família ColRNAI foi localizado em 70% dos isolados. Entretanto, os plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncC, IncN, IncR, IncQ1 e IncU foram encontrados em menos de 50% dos genomas bacterianos.

Em *A. baumannii*, não foram encontrados sequencias de plasmídeos nos genomas bacterianos. No entanto, elementos móveis como o transposons *Tn7-like* com os genes *Tn7* transposase, *Tn7* transposase B, *tnsC-like*, *Tn7* transposase D e *tnsE-like* foram

encontrados em 85% dos isolados de *A. baumannii*. A integrase (*IntI1*) foi encontrada em 71,4%. Tal como, as transposases Tn3 e Tn3 resolvase (TnpR) foram encontrados em 85% e 64% dos isolados, respectivamente.

Em *S. marcescens*, foram localizados alguns grupos de plasmídeos, em particular os plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncC e IncN em 75% e o plasmídeo do grupo IncQ1 foi encontrado em 62,5% dos isolados. Os plasmídeos do grupo IncF, do tipo IncFIB(K) e IncFII(K) estão presentes em 50% desses isolados. No entanto, o plasmídeo da família ColRNAI foi observado apenas em um isolado de *S. marcescens*.

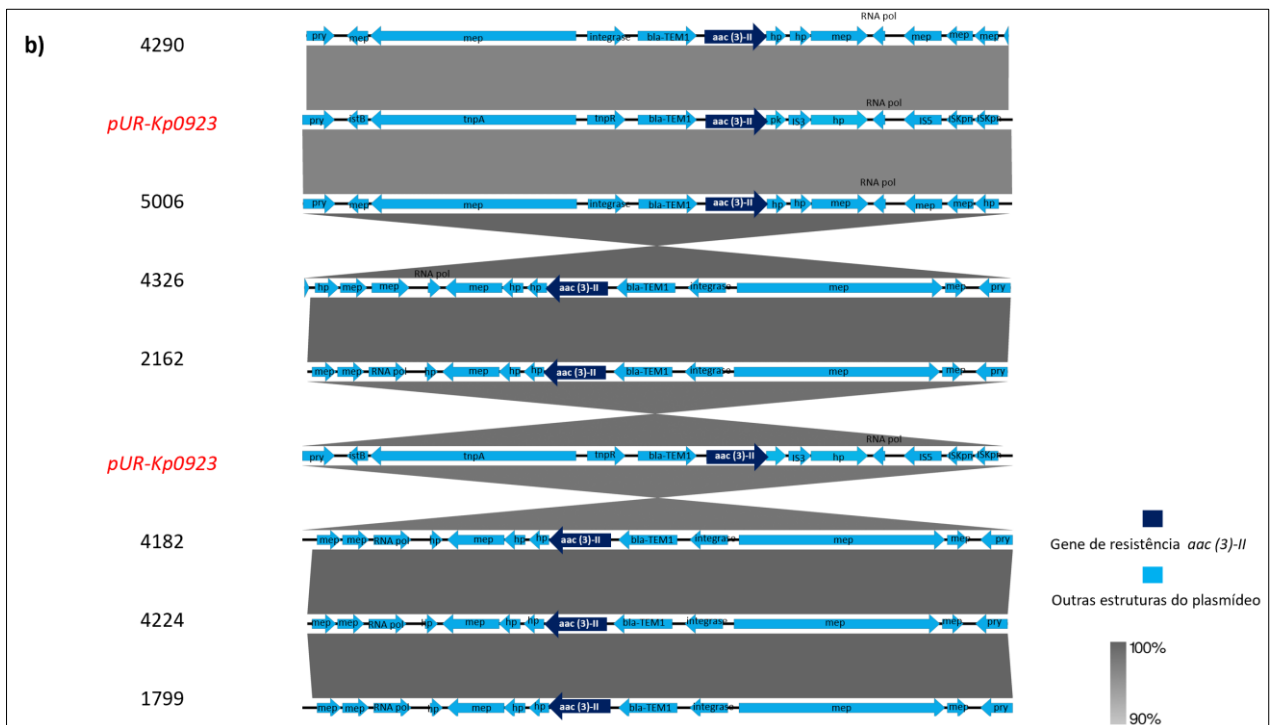
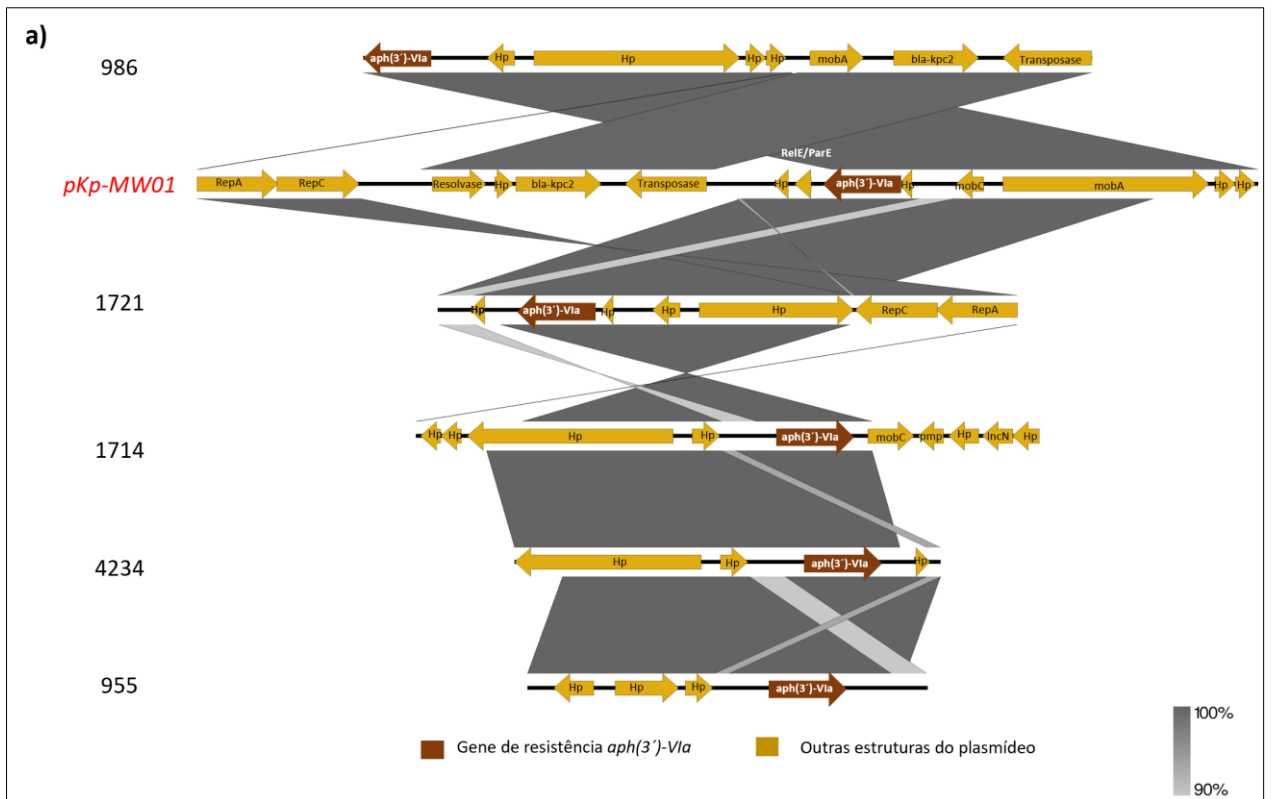
**Tabela 12.** Genes de resistência aos aminoglicosídeos presentes no cromossomo bacteriano ou plasmídeos nos isolados.

Microrganismo	genes	n (%)	Mutações n (%)	Cromossomo n (%)	Plasmídeo n (%)	Tipo de plasmídeo	Plasmídeo (% cobertura)
<b><i>K. pneumoniae</i></b> n= 40	<i>aadA1</i>	6 (15%)	1 (16%)	6 (100 %)	-		-
	<i>aadA2</i>	24 (60 %)	2 (8%)	-	24 (100%)		-
	<i>aph(3')-Ia</i>	24 (60 %)	10 (41%)	20 (83%)	4 (16%)		-
	<i>aph(3')-Via</i>	7 (17%)	6 (85%)	-	7 (100%)	ColRNAI,	pKp-MW01 (38%)
	<i>strA</i>	15 (37%)	5 (33%)	NA	NA	IncC,	-
	<i>strB</i>	14 (35%)	-	NA	NA	IncFIB(K),	-
	<i>Aac (3)-IIa</i>	15 (38%)	-	-	15 (100%)	IncFIB(pNDM-	pWP113a (88-100%)
	<i>Aac (3)-IId</i>	12 (30%)	-	-	12 (100%)	Mar),	p0239-FIHK (>10%)
	<i>aacA4</i>	3 (8%)	-	3 (100%)	-	IncFII(K),	-
	<i>Aac (6')-Ib</i>	8 (20%)	-	NA	NA	InHI2,	-
	<i>Aac (6')-Ib3</i>	15 (38%)	6 (53%)	-	15 (100%)	pKP1433, IncU,	pJHC-MW1 (>90%)
	<i>Aac (6')-Ic</i>	3 (8%)	1 (33%)	3 (100%)	-	IncR, IncQ1,	-
	<i>Aac (6')Ib-cr</i>	19 (48%)	5 (26%)	-	-	IncN	Integrans/ transposons
<i>rmtG</i>	1 (3%)	-	NA	NA		-	
<i>rmtB</i>	11 (28%)	-	11 (100%)	-		-	
<b><i>A. baumannii</i></b> n=20	<i>aadA1</i>	12 (60%)	12 (100%)	-	12 (100%)	A	Tn7-like transposon, Integrase (IntI1), transposase Tn3 (plasmídeo)
	<i>aadA2</i>	1 (5%)	1 (100%)	1 (100%)	-	A	-
	<i>ant(2'')-Ia</i>	1 (5%)	1 (100%)	-	1 (100%)	A	X02340
	<i>aph(3')-VIa</i>	6 (20%)	-	-	6 (100%)	A	X07753
	<i>strA</i>	9 (45%)	9 (100%)	9 (100%)	-	A	-
<i>strB</i>	14 (70%)	1 (7%)	14 (100%)	-	A	-	
<b><i>S. marcescens</i></b> n=12	<i>aadA1</i>	1 (11%)	-	-	1 (100%)		-
	<i>aadA6</i>	2 (22%)	2 (100%)	-	2 (100%)		-
	<i>ant(2'')-Ia</i>	7 (77%)	6 (85%)	-	7 (100%)	ColRNAI,	-
	<i>aph(3')-VIa</i>	6 (66%)	5 (71%)	-	6 (100%)	IncC,	-
	<i>aac(6')-Ib3</i>	7 (77%)	6 (85%)	7 (100%)	-	IncFIB(K),	-
	<i>aac(6')-Ib</i>	2 (22%)	-	2 (100%)	-	IncFII(K),	-
	<i>aac(6')-Ic</i>	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	-	IncQ1, IncN	-
<i>aac(6')Ib-cr</i>	7 (77%)	6 (85%)	7 (100%)	-		-	
<i>aac(6')-IId</i>	2 (22%)	-	2 (100%)	-		-	

A; ausência do plasmídeo; NA, não avaliado; -, sem informação.



Os genes de resistência, plasmídeos e outras características genotípicas foram registradas pelos programas ResFinder, PlasmidFinder e as bases de dados online do *Center of Genomic Epidemiology*. Além disso, com o uso do programa Artemis e o BLAST2 foi feita a curadoria manual e a análise de identidade dos genes/plasmídeos. No banco de dados do genoma NCBI foi feita uma pesquisa de elementos móveis, sequências de plasmídeos e/ ou transposons carreadores de genes de resistência para aminoglicosídeos (Tabela 12). Após análise dessas sequências, aquelas que tinham o mesmo número de nucleotídeos e identidade entre 86% -100% foram consideradas como o mesmo gene/plasmídeo, na Figura 20a, 20b e 20c estão ilustrados os principais plasmídeos agrupados com os isolados que apresentaram maior similaridade entre genomas.



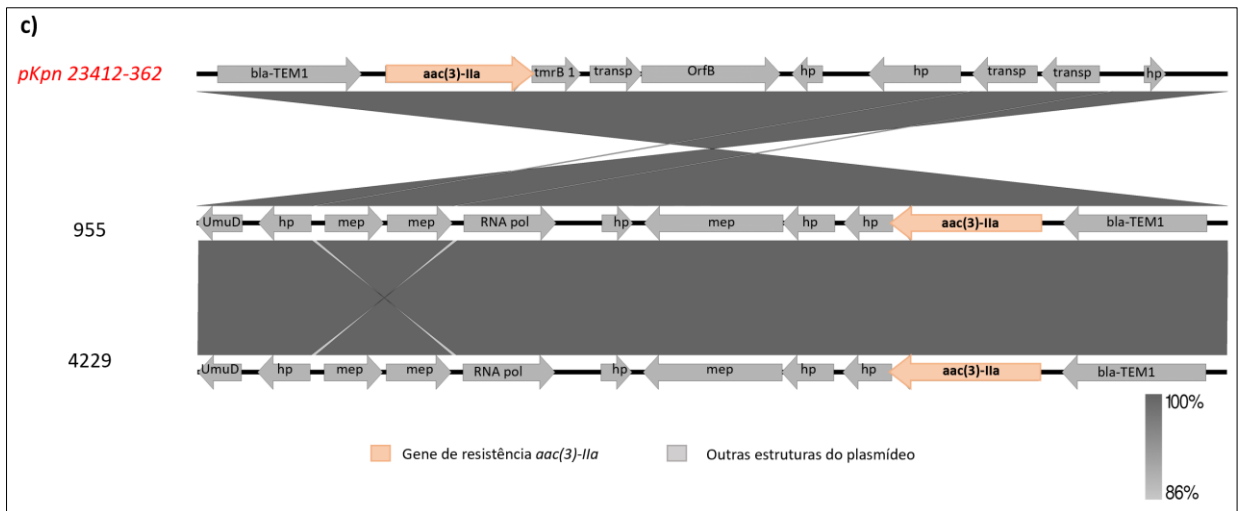
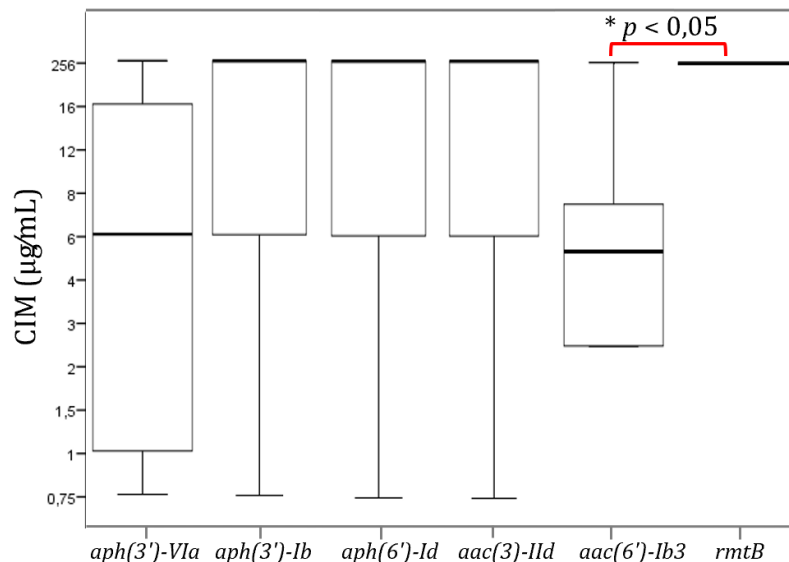


Figura 19. Principais plasmídeos associados a resistência nos aminoglicosídeos. A sequência de referência está destacada em vermelho. **A)** plasmídeo pKp MW01, *aph* (3')-*Via*. **B)** plasmídeo pUR-Kp0923, *aac* (3) -*II*. **C)** pKpn 23412-362, *aac* (3) -*IIa*. Os genes relacionados aos aminoglicosídeos, transposons, integrases de classe 1 e seqüências de inserção são indicadas nas setas de cada figura.

## 5.6 Relação entre os genes de resistência com o perfil de sensibilidade e o efeito de sinergismo antimicrobiano

### 5.6.1 Genes de resistência e o perfil de sensibilidade

Foram analisadas as relações entre os genes de resistência aos aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos com a CIM dos antimicrobianos avaliados. Em *K. pneumoniae* todos os isolados apresentaram pelo menos 1 gene de resistência para aminoglicosídeos, com CIM entre 4 - > 256 mg / L para amicacina. Aqueles isolados que apresentaram  $\geq 4$  genes de resistência exibiram a CIM mais alta para amicacina (> 256 mg / L). Como esperado, o isolado que expressou apenas 1 gene de resistência (*aph(3')-Ia*) teve a CIM mais baixa para amicacina (4 mg/L), exibindo sensibilidade para esse antibiótico. A caracterização do perfil de sensibilidades dos antimicrobianos mostrou que na presença do gene *blaKPC2*, 75% (30/40) isolados apresentaram resistência a CZA, meropenem e colistina. Além disso, o teste *Kruskall Wallis* mostrou que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os isolados de *K. pneumoniae* que possuem a EMA do tipo *aac(6')-Ib3* e a metilase *rmtB* associado a CIM elevada nos aminoglicosídeos, acima de 6 e 256 mg/L para cada gene, respectivamente (figura 21).



Teste estatístico <sup>a,b</sup>

	<i>aph(3')-VIa</i>	<i>aph(3')-Ib</i>	<i>aph(6')-Id</i>	<i>aac(3)-IIId</i>	<i>aac(6')-Ib3</i>	<i>rmtB</i>
Qui-quadrado	7,723	15,081	13,873	20,276	18,282	20,441
df	8	8	8	8	8	8
Significância Assintótica	,461	,058	,085	0,090	0,019*	0,009*

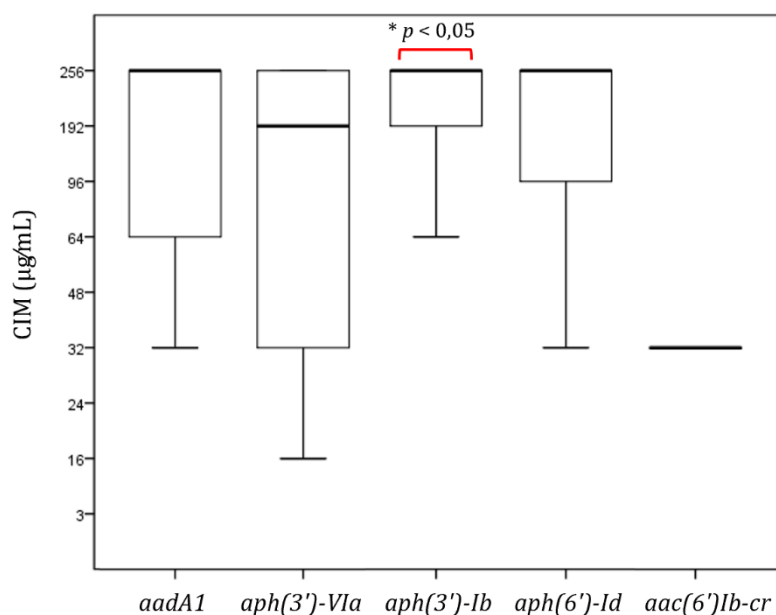
\* $p < 0,05$

a. Kruskal Wallis Test

b. Variável de agrupamento: CIM

Figura 20. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos 40 isolados de *K. pneumoniae*.

Em *A. baumannii*, os isolados que tinham  $\geq 3$  genes de resistência apresentaram CIM altas para amicacina (96 mg / L). Entretanto, os isolados que apresentaram  $\geq 4$  genes de resistência exibiram a CIM mais alta para amicacina ( $> 256$  mg/L). O isolado sem presença dos genes de resistência para aminoglicosídeos mostrou sensibilidade para os antibióticos testados. A análise pelo teste de *Kruskall Wallis* mostrou que a CIM elevada nos aminoglicosídeos, acima de 64 mg/L apresenta maior associação estatisticamente ( $p < 0,05$ ) com a presença da EMA do tipo *aph(3')-Ib*. Os genes *aph(6')-Id* e *aadA1* mostraram uma possível associação com o aumento da CIM ( $p < 0,10$ ) (figura 22).



Teste estatístico <sup>a,b</sup>

	<i>aadA1</i>	<i>aph(3')-VIa</i>	<i>aph(3')-Ib</i>	<i>aph(6')-Id</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>
Qui-quadrado	13,571	9,055	15,833	13,989	8,487
df	8	8	8	8	8
Significância Assintótica	,094	,338	,045*	,082	,387

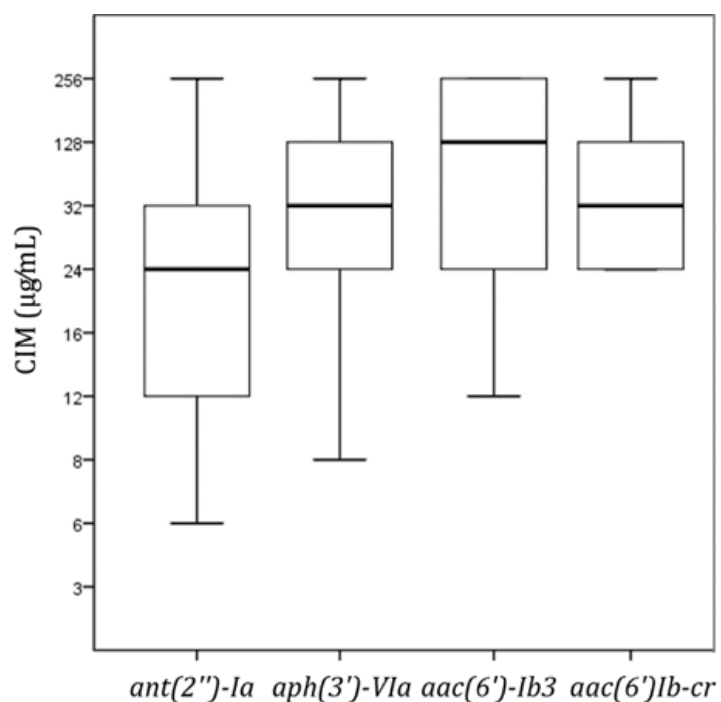
\* $p < 0,05$

a. Kruskal Wallis Test

b. Variável de agrupamento: CIM

Figura 21. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados de *A. baumannii*.

Por último, em *S. marcescens* todos os isolados apresentaram  $\geq 4$  genes de resistência, com CIM altas para amicacina ( $> 32$  mg / L). Entretanto, teve um isolado que apresentou 5 genes de resistência exibindo a CIM mais baixa para amicacina (8 mg / L), mostrando sensibilidade para esse antibiótico. Assim, o teste de *Kruskall Wallis* não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a presença dos genes de resistência e a elevação da CIM aos aminoglicosídeos (Figura 23). Porém, na presença do gene *aac (6') Ib-cr*, CIM  $\geq 24$   $\mu\text{g} / \text{mL}$  foram observadas. Finalmente, o número de genes de resistência e a o valor do FICI mostraram que mesmo isolados com 4 ou mais genes de resistência evidenciaram FICI baixos nas combinações, o que sugere que o efeito encontrado pode não se relacionar com o número de genes de resistência, e sim com o tipo mecanismo de resistência envolvido nessas combinações.



Teste estatístico <sup>a,b</sup>

	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-VIa</i>	<i>aac(6')-Ib3</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>
<b>Qui-quadrado</b>	5,296	6,600	8,250	8,556
<b>df</b>	8	8	8	8
<b>Significância Assintótica</b>	,725	,580	,409	,381

\* $p < 0,05$

a. Kruskal Wallis Test

b. Variável de agrupamento: CIM

Figura 22. Diferença nos valores de CIM de amicacina entre diferentes tipos de genes de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados de *S. marcescens*.

### 5.6.2 Genes de resistência associados ao efeito de sinergismo

O efeito do sinergismo na associação de antimicrobianos foi comparado com a presença dos genes de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos em todos os isolados. Na combinação de AK com COL, observou-se um efeito sinérgico de 69-74% para os isolados de *K. pneumoniae* que carregavam os genes *bla*TEM-1B, *bla*KPC-2 e associação de *bla*TEM-1B + *bla*KPC-2. No entanto, nenhuma associação significativa foi determinada. Na combinação de AK com MEM, observou-se menor efeito sinérgico ( $p < 0,05$ ) nos isolados que carregavam os genes *aph*(3')-Ib, *aph*(6')-Id, *aac*(3)-IId ou nessas associações *aph*(6')-Id + *bla*TEM-1B, *aph*(3')-Ib + *aph*(6')-Id, *aph*(3')-Ib + *bla*TEM-1B, *aph*(3')-Ib + *aph*(6')-Id + *bla*TEM-1B, *aac*(3)-Iia + *bla*KPC-2, *aac*(3)-Iid + *bla*TEM-1B, *aph*(3')-Ib + *aac*(3)-IId, *aph*(3')-Ib + *bla*KPC-2, *aph*(6')-Id + *aac*(3)-Iid e *aph*(6')-Id + *bla*KPC-2. Além disso, na presença do gene de metilase (*rmtB*) sozinho já mostraram maior efeito de indiferença entre 89-90% nessa combinação. Na combinação de AK com CZA, observou-se uma diferença significativa ( $p = 0,041$ ) entre os isolados que carregavam *bla*KPC-2 + *bla*TEM-1B e um menor efeito de sinergismo. A associação com os genes de aminoglicosídeos *aac*(3)-Iia e *aac*(6')-Ib3 com os genes de  $\beta$ -lactamases como *bla*KPC-2 + *bla*TEM-1B, *bla*CTX-M-2, *bla*KPC-2 + *bla*CTX-M-2 mostraram um maior efeito de indiferença entre 86-91% nessa combinação (tabela 13).



Tabela 13. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de *K. pneumoniae*. Se destaca em vermelho o valor *p* com significância estatística.

Genes de Resistencia nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> MDR	No. isolados de <i>K. pneumoniae</i>	Amicacina +Colistin			Amicacina + Meropenem			Amicacina + CZA		
		Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>
<i>blaKPC-2</i>	34	25 (74)	9 (26)	1,000	16 (47)	18 (53)	1,000	12 (35)	22 (65)	0,631
<i>blaTEM-1B</i>	30	21 (70)	9 (30)	0,192	11 (37)	19 (63)	1,000	11 (37)	19 (63)	1,000
<i>blaKPC-2 + blaTEM-1B</i>	26	18 (69)	8 (31)	0,182	11 (42)	15 (58)	1,000	7 (27)	19 (73)	0,041*
<i>aph(3')-Ib - strA</i>	17	10 (59)	7 (41)	0,451	3 (18)	14 (82)	0,004*	8 (47)	9 (53)	1,000
<i>aph(6')-Id - strB</i>	17	10 (59)	7 (41)	0,451	3 (18)	14 (82)	0,004*	8 (47)	9 (53)	0,741
<i>aph(6')-Id + blaTEM-1B</i>	17	10 (59)	7 (41)	0,451	3 (18)	14 (82)	0,004*	8 (47)	9 (53)	0,741
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id</i>	16	9 (56)	7 (43)	0,233	2 (13)	14 (88)	0,001*	8 (50)	8 (50)	0,689
<i>aph(3')-Ib + blaTEM-1B</i>	16	9 (56)	7 (43)	0,233	2 (13)	14 (88)	0,001*	8 (50)	8 (50)	0,689
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + blaTEM-1B</i>	16	9 (56)	7 (43)	0,233	2 (13)	14 (88)	0,001*	8 (50)	8 (50)	0,689
<i>aac(3)-IId</i>	15	10 (67)	5 (33)	0,432	3 (20)	12 (80)	0,022*	7 (47)	8 (53)	0,728
<i>aac(3)-Iia + blaKPC-2</i>	15	12 (80)	3 (20)	0,620	10 (67)	5 (33)	0,060	3 (20)	12 (80)	0,056
<i>aac(3)-Iid + blaTEM-1B</i>	15	10 (67)	5 (33)	0,630	3 (20)	12 (80)	0,022*	7 (47)	8 (53)	1,000
<i>aph(3')-Ib + aac(3)-IId</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,466	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	0,780
<i>aph(3')-Ib + blaKPC-2</i>	14	8 (57)	6 (43)	0,450	3 (21)	11 (79)	0,046*	5 (36)	9 (64)	0,900

<i>aph(6')-Id + aac(3)-Iid</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,466	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	1,000
<i>aph(6')-Id + blaKPC-2</i>	14	8 (57)	6 (43)	0,450	3 (21)	11 (79)	0,046*	5 (36)	9 (64)	0,900
<i>aac(6')-Ib3 + blaKPC-2</i>	14	11 (79)	3 (21)	0,730	9 (64)	5 (36)	0,466	2 (14)	12 (86)	0,02*
<i>aac(6')-Ib3 + blaTEM-1B</i>	14	12 (86)	2 (14)	0,739	8 (57)	6 (43)	0,450	2 (14)	12 (86)	0,02*
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + aac(3)-Iid</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,530	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	1,000
<i>aph(3')-Ib + aac(3)-Iid + blaTEM-1B</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,530	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	1,000
<i>aph(6')-Id + aac(3)-Iid + blaTEM-1B</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,530	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	1,000
<i>aph(6')-Id + blaKPC-2+ blaTEM-1B</i>	14	8 (57)	6 (43)	0,123	3 (21)	11 (79)	0,046*	5 (36)	9 (64)	0,890
<i>aac(3)-Iia + blaKPC-2+ blaTEM-1B</i>	14	11 (79)	3 (21)	0,431	9 (64)	5 (36)	0,466	3 (21)	11 (79)	0,046
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + aac(3)-Iid + blaTEM-1B</i>	14	9 (64)	5 (36)	0,466	2 (14)	12 (86)	0,007*	7 (50)	7 (50)	1,000
<i>blaCTX-M-2</i>	13	9 (69)	4 (31)	0,450	9 (69)	4 (31)	0,058	2 (15)	11 (85)	0,04*
<i>blaKPC-2 + blaCTX-M-2</i>	13	9 (69)	4 (31)	0,730	9 (69)	4 (31)	0,056	2 (15)	11 (85)	0,04*
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + blaKPC-2</i>	13	7 (54)	6 (46)	0,052	2 (15)	11 (85)	0,016*	5 (38)	8 (62)	0,059
<i>aph(3')-Ib + blaKPC-2+ blaTEM-1B</i>	13	7 (54)	6 (46)	0,052	2 (15)	11 (85)	0,016*	5 (38)	8 (62)	0,059
<i>aac(6')-Ib3 + blaKPC-2 + blaTEM-1B</i>	13	11 (85)	2 (15)	0,390	8 (62)	5 (38)	0,130	1 (8)	12 (92)	0,005*
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + blaKPC-2+ blaTEM-1B</i>	13	7 (54)	6 (46)	0,052	2 (15)	11 (85)	0,016*	5 (38)	8 (62)	0,059
<i>blaSHV-182</i>	12	6 (50)	6 (50)	0,064	5 (42)	7 (58)	1,000	4 (33)	8 (67)	1,000
<i>blaCTX-M-14</i>	11	5 (45)	6 (55)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,011*	5 (45)	6 (55)	0,266
<i>aph(3')-Ib + blaCTX-M-14</i>	11	5 (45)	6 (55)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,011*	5 (45)	6 (55)	0,266
<i>aph(6')-Id + blaCTX-M-14</i>	11	5 (45)	6 (55)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,011*	5 (45)	6 (55)	0,266

<i>aac(3)-Iia + blaCTX-M-2</i>	11	9 (82)	2 (18)	0,069	8 (73)	3 (27)	0,06	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + blaCTX-M-14</i>	11	5 (45)	6 (55)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,011*	5 (45)	6 (55)	0,266
<i>aph(3')-Ib + blaTEM-1B + blaCTX-M-14</i>	11	5 (45)	6 (55)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,011*	5 (45)	6 (55)	0,266
<i>aac(3)-Iia + aac(6')-Ib3 + blaKPC-2</i>	11	10 (91)	1 (9)	0,056	7 (64)	4 (36)	1,000	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>aac(3)-Iia + blaKPC-2 + blaCTX-M-2</i>	11	9 (82)	2 (18)	0,069	8 (73)	3 (27)	0,064	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>aac(3)-Iia + blaKPC-2 + blaOXA-2</i>	11	10 (91)	1 (9)	0,056	7 (64)	4 (36)	1,000	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>blaKPC-2 + blaTEM-1B + blaCTX-M-2</i>	11	8 (73)	3 (27)	1,000	7 (64)	4 (36)	1,000	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>blaKPC-2 + blaTEM-1B + blaOXA-2</i>	11	9 (82)	2 (18)	0,069	6 (55)	5 (45)	0,070	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + aac(3)-Iid + blaKPC-2</i>	11	7 (64)	4 (36)	1,000	2 (18)	9 (82)	0,073	4 (36)	7 (64)	1,000
<i>aph(3')-Ib + aac(3)-Iid + blaKPC-2 + blaTEM-1B</i>	11	7 (64)	4 (36)	1,000	2 (18)	9 (82)	0,073	4 (36)	7 (64)	1,000
<i>aph(6')-Id + aac(3)-Iid + blaKPC-2 + blaTEM-1B</i>	11	7 (64)	4 (36)	1,000	2 (18)	9 (82)	0,073	4 (36)	7 (64)	1,000
<i>aac(3)-Iia + aac(6')-Ib3 + blaKPC-2 + blaTEM-1B</i>	11	10 (91)	1 (9)	0,056	7 (64)	4 (36)	1,000	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>aac(6')-Ib3 + blaKPC-2 + blaTEM-1B + blaOXA-2</i>	11	9 (82)	2 (18)	0,069	6 (55)	5 (45)	0,070	1 (9)	10 (91)	0,027*
<i>blaKPC-2 + blaTEM-1B + blaCTX-M-2 + blaOXA-2</i>	11	9 (82)	2 (18)	0,069	6 (55)	5 (45)	0,090	1 (9)	10 (91)	0,032*
<i>rmtB</i>	10	5 (50)	5 (50)	0,192	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph(3')-Ib + rmtB</i>	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aac(3)-Iid + blaCTX-M-14</i>	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451

<i>rmtB</i> + <i>bla</i> TEM-1B	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,482
<i>rmtB</i> + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>bla</i> KPC-2+ <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	4 (40)	6 (60)	0,560
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>aph</i> (6')-Id + <i>rmtB</i>	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>aac</i> (3)-Iid + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> TEM-1B	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (6')-Id + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> TEM-1B	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (6')-Id + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (6')-Id + <i>bla</i> KPC-2+ <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	4 (40)	6 (60)	0,560
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>aph</i> (6')-Id + <i>aac</i> (3)-Iid + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>aph</i> (6')-Id + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> TEM-1B	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aph</i> (3')-Ib + <i>aph</i> (6')-Id + <i>rmtB</i> + <i>bla</i> CTX-M-14	10	5 (50)	5 (50)	0,085	1 (10)	9 (90)	0,013*	5 (50)	5 (50)	0,451
<i>aac</i> (3)-Iia + <i>aac</i> (6')-Ib3 + <i>bla</i> KPC-2+ <i>bla</i> OXA-2	10	9 (90)	1 (10)	1,000	6 (60)	4 (40)	0,090	1 (10)	9 (90)	0,032*
<i>aac</i> (3)-Iia + <i>bla</i> KPC-2+ <i>bla</i> TEM-1B + <i>bla</i> CTX-M-2	10	8 (80)	2 (20)	1,000	7 (70)	3 (30)	0,098	1 (10)	9 (90)	0,032*
<i>aac</i> (6')-Ib3 + <i>bla</i> KPC-22 + <i>bla</i> TEM-1B + <i>bla</i> CTX-M-2	10	8 (80)	2 (20)	1,000	6 (60)	4 (40)	0,090	1 (10)	9 (90)	0,032*
<i>aac</i> (3)-Iid + <i>rmtB</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	5 (56)	4 (44)	0,640
<i>rmtB</i> + <i>bla</i> KPC-2	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	4 (44)	5 (56)	1,000

<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + blaSHV-182</i>	9	3 (33)	6 (67)	0,003*	2 (22)	7 (78)	0,230	3 (33)	6 (67)	0,419
<i>aph(3')-Ib + aac(3)-Iid + rmtB</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	5 (56)	4 (44)	0,640
<i>aph(3')-Ib + rmtB + blaKPC-2</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	4 (44)	5 (56)	1,000
<i>aph(6')-Id + aac(3)-Iid + rmtB</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	5 (56)	4 (44)	0,640
<i>aph(6')-Id + rmtB + blaKPC-2</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	4 (44)	5 (56)	1,000
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + aac(3)-Iid + rmtB</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	5 (56)	4 (44)	0,640
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id + rmtB + blaKPC-2</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	4 (44)	5 (56)	1,000
<i>aph(6')-Id + aac(3)-Iid + rmtB + blaTEM-1B</i>	9	5 (56)	4 (44)	0,653	1 (11)	8 (89)	0,027*	5 (56)	4 (44)	0,640

**\*p value = <0,05; Fisher's exact test applied**

Nos isolados de *A. baumannii*, foi observado um efeito de indiferença de 86-92% ( $p < 0,05$ ) para os isolados que carregavam os genes *aadA1*, *aph(6')-Id*, *aph(3')-Ib* ou nas associações *aadA1 + aph(6')-Id*, *aadA1 + aph(3')-Via*, *aadA1 + aph(3')-Ib*, *aph(3')-Via + aph(6')-Id*, *aph(3')-Ib + aph(6')-Id*, *aadA1 + aph(3')-Via + aph(6')-Id*, *aadA1 + aph(3')-Ib + aph(6')-Id*, *aph(3')-Via + aph(3')-Ib*, *aadA1 + aph(3')-Via + aph(3')-Ib*, *aph(3')-Via + aph(3')-Ib + aph(6')-Id* e *aadA1 + aph(3')-Via + aph(3')-Ib + aph(6')-Id* na combinação de amicacina com meropenem. Um efeito sinérgico entre 60-82% foi observado entre AK e CZA nos isolados que carregam esses genes e/ou associações moleculares. Por outro lado, não foi observada correlação entre genes de resistência e a combinação de amicacina com colistina ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

Tabela 14. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de *A. baumannii*. Se destaca em vermelho o valor *p* com significância estatística.

Genes de Resistencia nos isolados de <i>A. baumannii</i> MDR	No. isolados de <i>A. baumannii</i>	Amicacina + Colistin			Amicacina + Meropenem			Amicacina + CZA		
		Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>
<i>aph(3')-Via</i>	16	8 (50%)	8 (50%)	0,375	4 (25%)	12 (75%)	0,546	11 (67%)	5 (31%)	0,153
<i>blaOXA-23</i>	16	7 (44%)	9 (56%)	1,000	5 (31%)	11 (69%)	0,657	9 (56%)	7 (44%)	0,465
<i>aadAI</i>	14	6 (43%)	8 (57%)	0,574	2 (14%)	12 (86%)	0,037*	9 (64%)	5 (36%)	0,455
<i>aph(6')-Id</i>	13	6 (46%)	7 (54%)	0,630	1 (8%)	12 (92%)	0,007*	9 (69%)	4 (31%)	0,251
<i>aadAI + aph(6')-Id</i>	13	6 (46%)	7 (54%)	1,000	1 (8%)	12 (92%)	0,007*	9 (69%)	4 (31%)	0,251
<i>aph(3')-Ib</i>	12	5 (42%)	7 (58%)	0,535	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aadAI + aph(3')-Via</i>	12	6 (50%)	6 (50%)	0,670	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aadAI + aph(3')-Ib</i>	12	5 (42%)	7 (58%)	1,000	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aph(3')-Via + aph(6')-Id</i>	12	6 (50%)	6 (50%)	0,670	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aph(3')-Via + blaOXA-23</i>	12	6 (50%)	6 (50%)	0,670	3 (25%)	9 (75%)	0,455	8 (67%)	4 (33%)	0,388
<i>aph(3')-Ib + aph(6')-Id</i>	12	5 (42%)	7 (58%)	1,000	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aadAI + aph(3')-Via + aph(6')-Id</i>	12	6 (50%)	6 (50%)	0,670	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aadAI + aph(3')-Ib + aph(6')-Id</i>	12	5 (42%)	7 (58%)	1,000	1 (8%)	11 (92%)	0,018*	9 (75%)	3 (25%)	0,113
<i>aadAI + blaOXA-23</i>	11	5 (45%)	6 (55%)	1,000	2 (18%)	9 (82%)	0,338	7 (64%)	4 (36%)	1,000
<i>aph(3')-Via + aph(3')-Ib</i>	11	5 (45%)	6 (55%)	1,000	1 (9%)	10 (91%)	0,038*	9 (82%)	2 (18%)	0,065
<i>aadAI + aph(3')-Via + aph(3')-Ib</i>	11	5 (45%)	6 (55%)	1,000	1 (9%)	10 (91%)	0,038*	9 (82%)	2 (18%)	0,085
<i>aph(3')-Via + aph(3')-Ib + aph(6')-Id</i>	11	5 (45%)	6 (55%)	1,000	1 (9%)	10 (91%)	0,038*	9 (82%)	2 (18%)	0,065
<i>aadAI + aph(3')-Via + aph(3')-Ib + aph(6')-Id</i>	11	5 (45%)	6 (55%)	1,000	1 (9%)	10 (91%)	0,038*	9 (82%)	2 (18%)	0,065
<i>blaTEM-1A</i>	10	5 (50%)	5 (50%)	1,000	1 (10%)	9 (90%)	0,070	8 (80%)	2 (20%)	0,085

\**p* value = <0,05; Fisher's exact test applied

Nos isolados de *S. marcescens*, foi observado 80% de efeito de indiferença nas combinações de AK com COL e AK com MEM para os isolados que carregam o gene *blaKPC-2* (p=0,091). No entanto, foi observado efeito de sinergismo de 75% (p=0,067) para os isolados que carregavam as EMAs do tipo *aac (6')-Ib3* e *ant (2'')-Ia + aac (6')-Ib3* na combinação de AK com MEM (p=0,067). Não foi observada significância estatística entre os genes e associações com o efeito de sinergismo na combinação de AK com CZA (tabela 15).



Tabela 15. Associação do efeito de sinergismo antimicrobiano e os genes de resistência nos isolados de *S. marcescens*. Se destaca em azul o valor *p* que foi considerado significativo para esses isolados.

Genes de Resistencia nos isolados de <i>S. marcescens</i> MDR	No. isolados de <i>S. marcescens</i>	Amicacina +Colistina			Amicacina + Meropenem			Amicacina + CZA		
		Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>	Sinergismo n (%)	Indiferença n (%)	Valor <i>p</i>
<i>blaKPC-2</i>	10	2 (20%)	8 (80%)	0,090*	2 (20%)	8 (80%)	0,091*	7 (70%)	3 (30%)	0,250
<i>ant(2'')-Ia</i>	9	4 (44%)	5 (56%)	1,000	4 (44%)	5 (56%)	0,560	8 (89%)	1 (11%)	1,000
<i>aph(3')-Via</i>	7	4 (57%)	3 (43%)	0,080	3 (43%)	4 (57%)	0,067*	6 (86%)	1 (14%)	1,000
<i>ant(2'')-Ia + aph(3')-Via</i>	7	4 (57%)	3 (43%)	1,000	3 (43%)	4 (57%)	1,000	6 (86%)	1 (14%)	0,220
<i>ant(2'')-Ia + blaKPC-2</i>	7	2 (29%)	5 (71%)	1,000	2 (29%)	5 (71%)	1,000	6 (86%)	1 (14%)	0,220
<i>aac(6')Ib-cr (int)</i>	6	2 (33%)	4 (67%)	1	2 (33%)	4 (67%)	1,000	4 (67%)	2 (33%)	1,000
<i>ant(2'')-Ia + aac(6')Ib-cr</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	0,640	2 (40%)	3 (60%)	0,640	4 (80%)	1 (20%)	0,150
<i>aph(3')-Via + aac(6')Ib-cr</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	0,640	2 (40%)	3 (60%)	0,640	4 (80%)	1 (20%)	0,150
<i>aph(3')-Via + blaKPC-2</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	0,640	1 (20%)	4 (80%)	0,127	4 (80%)	1 (20%)	0,150
<i>ant(2'')-Ia + aph(3')-Via + aac(6')Ib-cr</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	0,640	2 (40%)	3 (60%)	0,250	4 (80%)	1 (20%)	0,150
<i>ant(2'')-Ia + aph(3')-Via + blaKPC-2</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	0,640	1 (20%)	4 (80%)	0,127	4 (80%)	1 (20%)	0,150
<i>aac(6')-Ib3 (int)</i>	4	2 (50%)	2 (50%)	1,000	3 (75%)	1 (25%)	0,067	3 (75%)	1 (25%)	0,233
<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib3</i>	4	2 (50%)	2 (50%)	1,000	3 (75%)	1 (25%)	0,067	3 (75%)	1 (25%)	0,233
<i>aph(3')-Via + aac(6')-Ib3</i>	3	2 (67%)	1 (33%)	0,330	2 (67%)	1 (33%)	0,330	2 (67%)	1 (33%)	0,330
<i>blaTEM-1A</i>	2	1 (50%)	1 (50%)	1,000	1 (50%)	1 (50%)	1,000	1 (50%)	1 (50%)	1,000
<i>blaCTX-M-2</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	1,000	1 (100%)	0 (0%)	1,000	1 (100%)	0 (0%)	1,000
<i>blaOXA-1</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	1,000	0 (0%)	1 (100%)	1,000	0 (0%)	1 (100%)	1,000
<i>blaOXA-9</i>	1	0 (0%)	1 (100%)	1,000	0 (0%)	1 (100%)	1,000	0 (0%)	1 (100%)	1,000

\**p* value = <0,10; Fisher's exact test applied

A análise molecular entre os genes que apresentaram a relação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o gene de EMA e as combinações, foram mapeadas contra a referência específica NZ\_CP076812, de acordo com o ST mais próximo. As sequências consenso foram geradas e agrupadas de acordo com o resultado do sinergismo e mostraram que não houve diferenças aparentes ou variações nas suas sequências, como substituições de nucleotídeos (SNPs) ou inserções e deleções (Figura 24).

**A**

939_aph(6')-Id_indiferença	AAATTGAATGTCGTAACGACGGATTTTGGTTGGTCGGGTGAAACTATATATAAGTGCAC	10902
923_aph(6')-Id_sinergismo	AAATTGAATGTCGTAACGACGGATTTTGGTTGGTCGGGTGAAACTATATATAAGTGCAC	11022
997_aph(6')-Id_indiferença	AAATTGAATGTCGTAACGACGGATTTTGGTTGGTCGGGTGAAACTATATATAAGTGCAC	11142
1126_aph(6')-Id_indiferença	AAATTGAATGTCGTAACGACGGATTTTGGTTGGTCGGGTGAAACTATATATAAGTGCAC	10962
1018_aph(6')-Id_indiferença	AAATTGAATGTCGTAACGACGGATTTTGGTTGGTCGGGTGAAACTATATATAAGTGCAC	9550
	*****	

**B**



Figura 23. Resultado do alinhamento múltiplo de sequências, **A)** Ilustrado usando um conjunto de 5 genes *aph(6')Id* entre os grupos de combinações com sinergismo e indiferença em *A. baumannii*. **B)** Árvore filogenética não enraizada que ilustra a proximidade genética entre os grupos de isolados, representados em escala.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a atividades dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) em combinação com outras drogas contra bactérias gram-negativas multirresistentes, utilizando métodos de sinergismo *in vitro*, que possam ser aplicados no laboratório de microbiologia clínica.

A análise do perfil fenotípico desses isolados mostrou uma elevada resistência a meropenem, seguida de colistina e aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), respectivamente, e maior sensibilidade a ceftazidima-avibactam nos isolados de *K. pneumoniae*. Já nos isolados de *A. baumannii*, foi observada maior resistência a meropenem e ceftazidima-avibactam, seguida de colistina e os aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina. Quanto aos isolados de *S. marcescens*, foi verificado maior nível de resistência para meropenem, amicacina e gentamicina, e sensibilidade a ceftazidima-avibactam. Os achados deste estudo corroboram com o perfil epidemiológico do HCFMUSP e com estudos prévios conduzidos no Brasil e no mundo (97), (98), (49).

A interpretação do perfil de sensibilidade dos antibióticos é uma etapa crucial para o tratamento adequado de infecções bacterianas. No nosso estudo, observamos uma concordância moderada entre os critérios do CLSI e do BrCAST para *K. pneumoniae* ( $k=0,348$ ), uma concordância boa para *S. marcescens* ( $k=0,500$ ) e uma concordância muito boa para *A. baumannii* ( $k=0,737$ ). Foi observada uma diferença na categorização para pelo menos um antimicrobiano em todos os isolados, e uma redução na sensibilidade aos aminoglicosídeos foi constatada ao aplicar os critérios do BrCAST.

É importante destacar que no caso da interpretação do CZA, os discos podem possuir concentrações diferentes. No nosso estudo, utilizamos o disco comercial com a concentração 30/20 µg e interpretamos os resultados de acordo com as diretrizes do CLSI. Além disso, é importante ressaltar que os novos critérios do BrCAST para aminoglicosídeos em bactérias Gram-negativas estabelecem um ponto de corte para resistência consideravelmente maior do que o estabelecido pelo CLSI, assim como novos critérios que se aplicam somente a isolados de amostras de urina (99). Isso pode ter um impacto significativo na interpretação dos resultados de sensibilidade aos aminoglicosídeos em estudos futuros.

O estudo analisou a concordância entre diferentes testes de sensibilidade antimicrobiana em comparação com o método de microdiluição em caldo. Para os isolados de *K. pneumoniae*, a concordância essencial foi aceitável apenas para a colistina. Para amicacina, meropenem e CZA, a concordância essencial apresentou níveis abaixo de 90%. A concordância categórica foi aceitável em todas as drogas avaliadas, exceto para amicacina no método de disco difusão, achado que se relaciona com o estudo realizado por Nimalie D Stone *et al.*, 2006, entretanto o tipo de erros foram menores em ambos estudos (100).

Nos isolados de *A. baumannii* e *S. marcescens* foi observado que o método epsilométrico apresentou níveis aceitáveis de concordância essencial e categórica para a maioria dos antibióticos testados em ambos os isolados. Geralmente, os resultados do teste epsilométrico estão bem correlacionados com os valores de CIM gerados por métodos de microdiluição em caldo ou em ágar, segundo vários estudos (101), (102), (103). Entretanto o método de disco difusão apresentou resultados abaixo do considerado aceitável, na literatura se evidencia que ele continua sendo um método de teste de sensibilidade antimicrobiana pouco confiável para colistina em Enterobacteriaceae (104). Porém, esse método é especialmente útil na detecção de resistência, especialmente em laboratórios que não possuem recursos de alta complexidade.

Os resultados obtidos neste estudo foram avaliados em conformidade com as diretrizes da FDA para dispositivos de teste, que estabelecem que os erros significativos atribuíveis ao dispositivo de teste devem ser inferiores a 1,5% para comparações individuais entre espécies ou antibióticos, e não devem exceder 3%. Conforme dados publicados por Jorgensen e Ferraro *et al.*, 2009, os resultados deste estudo mostraram uma aceitação satisfatória na concordância categórica para todos os antibióticos nas diferentes espécies, em consonância com as metas estabelecidas pela FDA (83).

No presente estudo, foram identificados os principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, sendo as EMAs e os genes que codificam a carbapenemase KPC-2 os mais destacados em enterobactérias, como *K. pneumoniae* e *S. marcescens*. O que é uma tendência cada vez mais descrita em todo o mundo (49) (12). Além disso, nossos resultados indicam que os mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo estão associados a vários genes de resistência aos aminoglicosídeos e outras drogas. A análise das porinas revelou uma alta frequência de mutações e deleções relacionadas à

resistência a várias classes de antibióticos. Esse achado é importante, uma vez que a perda das porinas pode resultar em uma resistência aos aminoglicosídeos, conforme observado em outros estudos (98).

Entre as EMAs mais frequentes, destacam-se os genes *aadA2* e *aph(3')-Ia* e a presença das metilases *rmtB* e *rtmG* associada à resistência à algumas classe de aminoglicosídeos, conforme evidenciado em outros estudos, principalmente em isolados de *K. pneumoniae* pertencentes ao ST11 (105), (106), (107). Em relação aos isolados de *A. baumannii*, observou-se uma frequência elevada de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) e da oxacilinase OXA<sub>23</sub>, em concordância com estudos anteriores realizados no Brasil que também destacaram o predomínio dessa oxacilinase (108), (109), (110). Os genes de EMAs, em particular os tipos *strA* e *strB*, juntamente com o gene *aadA1*, foram os mais prevalentes nos isolados analisados, como previamente relatado em estudos anteriores que associaram esses genes a elementos genéticos móveis (111), (112). No que diz respeito aos isolados de *S. marcescens*, os genes *aac(6')-Ic* e *aac(6')-Ib3* foram os mais frequentemente observados, corroborando achados prévios em estudos que avaliaram EMAs em 200 bactérias Gram-negativas (105). Assim como, o estudo publicado por Deniz Gür, 2020 mostrou o primeiro relato da presença do gene *blaOXA-48* e a metilase *armA* em isolados de *S. marcescens* (113). A disseminação desses genes no mundo se deve a uma combinação de fatores, incluindo a mobilidade genética dos plasmídeos contendo esses genes, o uso inadequado de antibióticos e a transmissão horizontal entre diferentes espécies bacterianas.

As mutações encontradas nos genes de resistência aos aminoglicosídeos foram consideradas mutações que não alteravam a constituição das proteínas. Conforme descrito na literatura científica, as mutações sinônimas geralmente não alteram a estrutura da proteína, mas podem afetar outros aspectos, como a velocidade de tradução e a estabilidade do RNA mensageiro (114). No entanto, a relevância desses genes de resistência aos aminoglicosídeos reside na sua presença em plasmídeos e elementos genéticos móveis, que estão diretamente relacionados à transferência horizontal de genes. Recentemente, um estudo conduzido por Ann A. Elshamy e colaboradores identificou plasmídeos do grupo IncX3 que carregavam o gene *aph(3')-Via*, além de outros genes que conferem resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos (115).

Em nosso estudo os plasmídeos pUR-Kp0923, pKp-B199 e pKpn23412-362 foram os mais frequentes e apresentaram maior cobertura na presença do gene *aac(3)-II*. Destaca-se na literatura o plasmídeo pUR-Kp0923, pela disseminação de resistência a antibióticos em *K. pneumoniae*, incluindo o gene *blaCTX-M-2* (115). Estudos anteriores identificaram 66 genes de resistência aos aminoglicosídeos presentes em plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade F, FIA, FIB ou HI2 (41). APH(3')-VIa é a única enzima APH descrita em *S. marcescens*, esse gene também foi encontrado em um plasmídeo, no caso R478, com uma prevalência de 20% dos isolados de *S. marcescens* de um hospital argentino (116).

Os principais genes de EMAs envolvidos na resistência aos aminoglicosídeos são os genes *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* e *aph(3')-Via* os quais são conhecidos por conferirem resistência a tobramicina, gentamicina e amicacina, respectivamente (105). Esses também foram alguns dos resultados desta pesquisa, destacando a importância da monitorização constante da disseminação desses genes e do uso racional de antibióticos para evitar o surgimento e disseminação de resistência bacteriana.

Esse estudo revelou uma associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a CIM da amicacina superior a 256 µg/mL e a presença dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, *aac(6')-Ib3* e metilase *rmtB*, em isolados de *K. pneumoniae*. Esses resultados são consistentes com o estudo realizado por Deniz Gür na Turquia em 2020, que também demonstrou a presença do gene *aac(6')-Ib* e as metilases *rmtB*, *rmtC* e *rmtF* em bactérias Gram negativas, demonstrando uma associação com o aumento da CIM da amicacina, que variava entre 16 mg/L e 256 µg/mL na presença das metilases (113). Esses achados ressaltam a importância clínica desses genes e metilases, pois o aumento da CIM da amicacina indica uma redução na eficácia desse antibiótico.

Em nosso estudo, houve uma relação significativa entre a CIM da amicacina superior a 64 µg/mL nos isolados de *A. baumannii* e a presença do gene *aph(3')-Ib*. Esses resultados podem estar em concordância com estudos anteriores que indicaram uma elevada resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* e a presença do gene *aph(3')-VIa* (acima de 90%). No entanto, esses estudos não estabeleceram relação entre fenótipo e os determinantes genéticos (117). Essa falta de associação pode ser atribuída à menor porcentagem de resistência à amicacina observada nesses isolados. Por outro lado, em relação aos isolados de *S. marcescens*, não foi observada diferença significativa na CIM

da amicacina em função da presença de uma determinado EMA. Entretanto, a detecção do gene cromossômico *aac(6')-Ic* sugere que os níveis reduzidos de mRNA deste gene, juntamente com uma grande sequência palindrômica sobreposta à região -35, poderiam estar associados à ausência de alterações na sensibilidade aos aminoglicosídeos, segundo relatados em outros estudos (118), (119).

Com base em nossas descobertas sobre a coexistência de várias enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e seu impacto no perfil de resistência, estudos prévios reportam que todas as cepas que possuíam a enzima AAC (6')-Ib demonstraram resistência à tobramicina e que 16% dessas cepas também apresentaram sensibilidade reduzida à amicacina. Quando a enzima AAC(6')-Ib estava combinada com outra enzima, os valores da CIM para gentamicina, tobramicina e plazomicina foram significativamente maiores do que quando a enzima AAC(6')-Ib estava presente sozinha (com valores de *p* de 0,01, 0,0008 e 0,046, respectivamente) (42).

Em relação ao sinergismo *in vitro*, o uso "*off-label*" de antimicrobianos pode levar a resultados promissores, mas é importante enfatizar que a eficácia e a segurança do uso combinado desses medicamentos ainda precisam ser estabelecidas em estudos clínicos adequados. Além disso, compreender como acontece o sinergismo entre os diferentes antibióticos deve ser baseada em estudos de sensibilidade *in vitro* e considerando a patogenicidade do microrganismo. Por tanto, nosso estudo representa uma nova evidencia sobre os estudos de sinergismo *in vitro* para aprimorar o uso dos aminoglicosídeos no tratamento de infecções bacterianas e combater o desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

O estudo do sinergismo enfrenta desafios significativos dado que existem diversos fatores que podem influenciar a correlação entre os resultados obtidos em testes *in vitro* e a resposta terapêutica. Até agora, o CLSI e o EUCAST não estabeleceram critérios que definam de forma clara a metodologia das combinações o que dificultam a comparação direta e a generalização dos resultados obtidos (120). Isso ressalta a necessidade de abordagens cuidadosas e estudos bem projetados para avaliar o sinergismo antimicrobiano de maneira precisa e confiável. Nosso estudo comparou três métodos distintos, dentre eles o padrão-ouro (*Time-kill*), com o objetivo de avaliar a concordância e os tipos de erros nas combinações. Verificou-se que os dois métodos adicionais avaliados demonstraram altas taxas de concordância em relação ao padrão-ouro, com

significância estatística ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos corroboram com a discussão apresentada por F. C. Odds., 2003 sobre a complexidade das interações medicamentosas e a importância de utilizar múltiplos métodos para determinar os efeitos da terapia combinada (81).

Nossos resultados sugerem que o método de disco aproximação é altamente eficiente na avaliação da eficácia de combinações de antimicrobianos, especificamente para a combinação de amicacina com colistina em *K. pneumoniae* e amicacina com CZA em *S. marcescens* ( $K = 1$ ;  $p < 0,001$ ), em comparação com o método *time kill*. Esses achados corroboram com os resultados de J. Gaudereto *et al.*, 2019, que também relatou uma boa concordância entre esses métodos na avaliação da combinação de amicacina com meropenem (65). Portanto, o método de disco aproximação pode ser considerado uma alternativa viável e eficaz para a avaliação da eficácia de combinações de antimicrobianos. Embora o método de disco aproximação tenha demonstrado boa concordância com o *time-kill* nas combinações de antibióticos a 0,5x e 1x CIM, estudos anteriores sugerem que o método Epsilométrico é mais confiável na detecção de sinergismo *in vitro* (82), (80).

Em uma pesquisa com cepas ATCC, a concordância entre os resultados do teste epsilométrico e do *time-kill* ocorreu quando ambos antimicrobianos apresentaram 2x CIM, atingindo uma taxa de 75% de concordância (82). Na literatura há poucos estudos de sinergismo *in vitro* utilizando o teste epsilométrico nas combinações que foram avaliadas no nosso estudo. Entretanto, um estudo recente avaliou 200 isolados de *A. baumannii* e 106 de *K. pneumoniae*, que testaram a colistina em combinação com meropenem, rifampicina, daptomicina, ceftazidima/avibactam e aztreonam, concluindo que o método de fita gradiente (E-test) pode ser utilizado como uma ferramenta simples em laboratórios de microbiologia clínica para orientar os clínicos na escolha adequada da terapia para esses patógenos (121). Esse resultado reforça a recomendação do uso do teste epsilométrico devido ao seu bom desempenho e concordância do método.

Neste estudo, foram realizadas combinações de colistina, meropenem e CZA com amicacina e gentamicina pelos métodos descritos, observou-se um efeito sinérgico de 72,6% em *K. pneumoniae* utilizando o método Epsilométrico. Em um estudo semelhante, embora com um número menor de isolados ( $n=11$ ), as combinações de colistina com amicacina ou fosfomicina, em concentrações subinibitórias, mostraram sinergismo contra



72,7% (8/11) dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes a colistina testados pelo método de *checkerboard* (67). A variância calculada da redução da CIM de amicacina quando combinada com colistina foi de 2,36 em relação à CIM da droga isolada.

Nossos resultados indicaram que a combinação de amicacina e meropenem apresentou baixo efeito sinérgico (<50%), e uma variância da redução da CIM de amicacina quando combinada com meropenem de 9,24 em relação à CIM da droga isolada. Entretanto, Enbo Liu e colaboradores (2021) observaram elevada taxa de sinergismo *in vitro* com a combinação de amicacina com meropenem, principalmente entre isolados de *K. pneumoniae*, incluindo os que carregavam os genes *blaVIM* e *blaKPC*. Por outro lado, esse estudo também mostrou altos efeitos sinérgicos entre colistina e amicacina, com reduções significativas do  $\log_{10}$ UFC/mL em comparação com o uso isolado do medicamento mais ativo (122). No entanto, é importante ressaltar que esses achados podem variar entre diferentes linhagens de isolados e mecanismos de resistência, indicando uma possível influência desses fatores na resposta observada. Similar ao nosso estudo, Kulengowski *et al.* 2018 demonstraram que não há efeito sinérgico entre a amicacina e o meropenem contra CRE resistente à amicacina, mas há uma importante redução da CIM da amicacina (123).

A porcentagem de efeitos sinérgicos para a combinação de amicacina com CZA também foi baixa para os isolados de *K. pneumoniae* (40%), e uma variância da redução da CIM de amicacina quando combinada com CZA de 1,42 em relação a CIM da droga isolada. Em um estudo análogo, a associação entre amicacina e ceftazidima/avibactam demonstrou ser particularmente eficaz em cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. A análise pelo *time-kill* evidenciou o efeito sinérgico dessa combinação com uma redução de 2,15  $\log_{10}$  UFC/mL, possivelmente devido à restauração da atividade contra esses microrganismos. Além disso, esse estudo demonstrou reduções significativas da CIM quando ceftazidima/avibactam é utilizada em combinação com outros antibióticos, especialmente o meropenem, seguido de amicacina e aztreonam (78). Embora o número de efeitos sinérgicos observados para a combinação de amicacina com CZA em *K. pneumoniae* tenha sido menor em relação às outras combinações testadas no estudo, os resultados sugerem que essa associação pode ser uma opção terapêutica potencial para patógenos de difícil tratamento.

Nossa pesquisa revelou que a combinação de amicacina e colistina nos isolados de *A. baumannii* mostrou que 50% dos isolados foram sinérgicos pelo método epsilométrico, sendo que o perfil de resistência à colistina foi mais frequente nesses isolados. Assim, a variância da redução da CIM da amicacina, quando combinada com colistina, foi de 2,34 em relação à CIM da droga isolada. Apesar de não terem estudos de sinergismo entre amicacina e colistina, um estudo prévio conduzido por Leite *et al.*, 2016, que demonstrou que a combinação de colistina com rifampicina, seguida de colistina com vancomicina, apresentou o maior efeito sinérgico pelo método *checkerboard* em isolados resistentes à colistina (61). Entretanto, em um outro estudo que avaliou 14 isolados de *A. baumannii* resistentes à colistina quando combinados com amicacina e outras drogas, foi observado que 5 dos isolados apresentaram um efeito indiferente em relação às combinações, de acordo com o método de *checkerboard*. É importante destacar que, nesses casos, os valores das CIM foram elevados para amicacina (124).

Um outro estudo que avaliou o efeito sinérgico da combinação de ceftazidima-avibactam e meropenem contra isolados de *A. baumannii* encontrou um maior efeito de indiferença nas cepas de *A. baumannii* panresistentes (65). No entanto, em nossos achados, foi observado um maior efeito de atividade da CZA quando combinada com amicacina. Embora ainda haja pouca literatura sobre associações entre antibióticos e inibidores de  $\beta$ -lactamases, um estudo recente conduzido por Tao Chen *et al.*, 2020 avaliou a atividade *in vitro* da ceftazidima-avibactam, isoladamente e em combinação com amicacina, contra patógenos Gram-negativos resistentes a CZA, produtores de NDM. Este estudo observou sinergismo em 47,6% (10/21) e efeito aditivo em 52,4% (11/21) das combinações de CZA com amicacina (125). Dados semelhantes aos nossos em *K. pneumoniae* (40%) e *A. baumannii* (45%); e a variância da redução da CIM da amicacina quando combinada com CZA foi de 2,56 em relação à CIM da droga isolada.

Na combinação de amicacina e meropenem, foi observado o menor efeito sinérgico em comparação com as outras combinações testadas. Houve uma maior variância da redução da CIM da amicacina quando combinada com o meropenem de 3,19 em relação à CIM da droga isolada. Além disso, em nosso estudo, foi observada uma menor porcentagem de isolados sinérgicos em comparação com um estudo anterior que avaliou várias combinações entre carbapenêmicos e outras drogas. Nesse estudo anterior,

as combinações de imipenem e fosfomicina, meropenem e amicacina, imipenem e amicacina, e imipenem e colistina foram sinérgicas contra *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos em 65,2%, 46,2%, 30,8% e 17,4%, respectivamente. Surpreendentemente, a combinação de imipenem e fosfomicina foi a mais eficaz neste estudo contra *A. baumannii*, que é intrinsecamente resistente à fosfomicina (126). Isso confirma as descobertas dessa pesquisa sobre outras drogas testadas em bactérias com resistência intrínseca. Segundo os autores, essa combinação pode ser explicada pelo fato de que tanto o imipenem quanto a fosfomicina inibem a síntese da parede celular, o que pode levar a um aumento na inibição da síntese da parede celular em *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos quando combinados.

No presente estudo observou-se um maior efeito de sinergismo na combinação de amicacina com ceftazidima-avibactam em 50% dos isolados de *S. marcescens* avaliados, e uma variância da redução da CIM de amicacina quando combinada com CZA de 0,36 em relação à CIM da droga isolada. Embora a literatura contenha poucas informações sobre sinergismo *in vitro* em isolados de *S. marcescens*; Gaudereto e colaboradores (2019) no estudo demonstrou maior atividade da CZA em combinação com meropenem em isolados MDR de *S. marcescens*, utilizando o método de disco de aproximação (65). O efeito sinérgico foi observado nesses microrganismos, mesmo quando carregavam o gene *blaKPC-2* e alterações na proteína da membrana externa (OMP). Esses achados são consistentes com os resultados de nossa pesquisa, que também identificou sinergia na presença desses mecanismos de resistência.

Todavia, a atividade de sinergismo *in vitro* de amicacina combinada com meropenem não apresentou efeito tão favorável quanto com CZA, com uma variação de 3,30 da redução da CIM de amicacina quando combinada com meropenem. Ainda não temos dados da literatura sobre essa combinação, entretanto, um estudo anterior realizado pelo nosso grupo observou que a combinação de colistina com meropenem apresentou sinergismo contra um isolado de *S. marcescens* utilizando o método de *time-kill* (127). Também, outro estudo brasileiro conduzido por Bart *et al.*, 2015 avaliou a atividade da polimixinas B com imipenem, meropenem e tigeciclina em cepas produtoras do gene *blaKPC*, observaram a combinação de polimixina B com meropenem teve atividade sinérgica contra duas cepas (100%) de *S. marcescens* que são intrinsecamente resistentes às polimixinas (128).

A combinação de amicacina com colistina mostraram maior efeito de indiferença e antagonismo pelo método Epsilométrico e disco aproximação, respectivamente. Um estudo observou que os isolados de *S. marcescens* apresentaram antagonismo (FICI >4) na combinação entre tigeciclina com colistina (129). A descrição de antagonismo ascende um alerta para o fato de que nem sempre a terapia combinada é sinérgica ou indiferente, não há consenso sobre como prever que a adição de um antimicrobiano traria impacto apenas ecológico, mas também negativo para o desfecho clínico (130).

A situação epidemiológica presente no HCFMUSP possibilitou a análise de um número de isolados de *S. marcescens* resistente a carbapenêmicos, com o objetivo de investigar alternativas viáveis para o tratamento dessa bactéria, devido a importância associada a surtos e que acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, como já foi abordado o perfil fenotípico e genotípico em um estudo anterior (131). Questiona-se, diante da alta prevalência desses patógenos resistentes a carbapenêmicos, se seria adequado implementar o uso de polimixinas como terapia empírica ou combinada, inclusive em microrganismos com resistência intrínseca a esse antibiótico.

Embora a frequência de sinergismo observada na combinação de gentamicina com colistina, meropenem e CZA tenha sido menor em comparação com a amicacina, o efeito observado demonstrou um desempenho satisfatório, semelhante ao da amicacina. Por outro lado, também foi observado efeito de antagonismo na combinação de gentamicina com colistina em isolados de *S. marcescens*. Não sabemos quanto isso pode ser influenciado pela resistência intrínseca desta bactéria à classe das polimixinas. É importante destacar que tais achados são relevantes no contexto do desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra infecções causadas por patógenos resistentes a múltiplos antibióticos. Considerando os resultados obtidos, evidencia-se que a amicacina apresentou maior atividade quando comparada à gentamicina em combinação com outras drogas. Tal fato é corroborado por estudos realizados por Firmo e colaboradores que relataram uma curva de crescimento semelhante na presença ou não da gentamicina e o crescimento bacteriano, possivelmente devido aos altos valores de CIM encontrados para este antimicrobiano nos isolados testados, além da menor eficácia das combinações envolvendo gentamicina (132). A partir desses achados, sugere-se que a amicacina seja a opção mais indicada para estudos de sinergia *in vitro*. Infelizmente, os dados levantados sobre o sinergismo e antagonismo da gentamicina com outras drogas não permitem

conclusões robustas, uma vez que não foi possível realizar a comparação com o método Epsilométrico devido à indisponibilidade do E-test.

Por tanto, para determinar o potencial de sinergismo dessas combinações, já que cepas com esse fenótipo "desfavorável" estão surgindo e desafiando as terapias antimicrobianas existentes, são necessários realizar mais estudos *in vitro* com uma amostra maior de isolados e avaliar a farmacocinética/farmacodinâmica.

Com base nos objetivos da pesquisa, constatou-se uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ) entre as combinações de antibióticos que apresentaram pelo menos um antibiótico sensível em cada associação e o efeito de sinergismo *in vitro*. Nossos achados corroboram com o estudo de Ontong *et al.*, 2021, que observaram uma maior evidência de sinergismo *in vitro* entre os isolados resistentes à colistina e sensíveis à amicacina (67). Os resultados obtidos neste estudo reforçam a validade e a consistência dos achados anteriores na literatura científica sobre o sinergismo *in vitro* entre diferentes combinações de antibióticos.

Outra questão que investigamos em nosso estudo é a possível relação entre os mecanismos de resistência e o efeito sinérgico ou indiferente das combinações de antibióticos. No entanto, essa temática ainda é pouco compreendida e diversos fatores podem influenciar no sinergismo ou não sinergismo entre os antibióticos, incluindo os mecanismos de resistência presentes nas bactérias. Por exemplo, se uma bactéria produz uma enzima que inativa um determinado antibiótico, o uso de outro antibiótico que não é afetado por essa enzima pode levar a uma sinergia, uma vez que os dois antibióticos atuam em diferentes pontos da via metabólica da bactéria (133). Em contrapartida, se a bactéria possui um mecanismo de resistência que reduz a entrada de um antibiótico na célula, o uso de outro antibiótico que também tem dificuldade em entrar na célula pode levar a uma interação não sinérgica, tornando ambos os antibióticos ineficazes (134).

Na combinação de amicacina com colistina, observou-se sinergia de 69-74% em isolados de *K. pneumoniae* portadores de *bla*TEM-1B, *bla*KPC-2 e *bla*TEM-1B+*bla*KPC-2. No entanto, não foi achada significância estatística nessas associações.

Na combinação de amicacina com meropenem, observou-se menor sinergia ( $p<0,05$ ) em isolados que abrigavam os genes *aph(3')-Ib*, *aph(6')-Id*, *aac(3)-IId* ou as suas associações. Além disso, o gene de metilase (*rmtB*) isolado e algumas associações

apresentaram um alto efeito de indiferença, em 89-90% das amostras, nessa combinação. Na combinação de amicacina com CZA, observou-se uma sinergia significativamente menor ( $p=0,041$ ) em isolados que abrigavam *blaKPC-2 + blaTEM-1B*. As associações com os genes de aminoglicosídeos *aac (3) -Iia* e *aac (6') -Ib3* e genes de beta-lactamases, como *blaKPC-2 + blaTEM-1B*, *blaCTX-M-2*, *blaKPC-2 + blaCTX-M-2*, apresentaram um alto efeito de indiferença, de 86-91%, nessa combinação. Em um estudo de sinergismo *in vitro* realizado em cepas de enterobactérias, verificou-se que as combinações dos aminoglicosídeos com isolados resistentes a colistina apresentaram um maior efeito de sinergismo, especialmente em *K. pneumoniae*, enquanto que o efeito foi menor em *S. marcescens*. É importante destacar que a maioria dos isolados apresentava genes do tipo *blaKPC* e pertenciam aos ST11, ST258 e ST340, os quais já foram descritos como os mais prevalentes no Brasil (48), reforçando a validade dos nossos resultados. Adicionalmente, a presença do gene *blaCTX-M-14* associado a outros genes de resistência aos aminoglicosídeos demonstrou uma redução significativa ( $p= 0,014$ ) no efeito sinérgico da combinação de amicacina com CZA. Este fato foi discutido em um estudo que demonstrou que uma mutação no gene *blaCTX-M-14* resulta na hidrólise da ceftazidima e em um menor efeito na combinação de drogas (135).

Nos isolados de *A. baumannii*, foi observado um efeito de indiferença em 86-92% ( $p < 0,05$ ) dos isolados que carregavam *aadA1*, *aph(6')-Id*, *aph(3')-Ib* ou suas associações na combinação amicacina com meropenem. Entretanto, foi observado um efeito de sinergismo em 60-82% entre amicacina e CZA dos isolados que carregavam esses genes e/ou associações. Não foi observada correlação entre os genes de resistência e a combinação de amicacina com colistina ( $p > 0,05$ ). Além disso, a presença do gene *blaOXA<sub>23</sub>* esteve presente em maior porcentagem nas associações de amicacina com colistina e meropenem, com resultados de indiferença, mas não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa. No estudo realizado por Sharma *et al.*, 2022 mencionam que foi observada uma sinergia reduzida ( $p = < 0,0001$ ) para aqueles isolados que possuem apenas o gene *blaNDM* ou co-produtores com *blaOXA<sub>51</sub> + blaOXA<sub>23</sub>* (136). Entretanto, essas associações de genes não foram encontradas no nosso estudo.

Similar aos outros microrganismos, em *S. marcescens* não há relatos de estudos que avaliem a presença das EMAs ou metilases com a presença do sinergismo *in vitro*. Nos isolados de *S. marcescens*, foi observado que 80% das amostras apresentaram efeito

de indiferença para ambas as combinações de amicacina com colistina e amicacina com meropenem em isolados portadores do gene *blaKPC<sub>2</sub>* ( $p=0,091$ ). No entanto, foi observado um efeito de sinergismo de 75% ( $p=0,067$ ) nos isolados que carregavam os genes *aac (6')-Ib3* e *ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib3* na combinação de amicacina com meropenem ( $p=0,067$ ). Além disso, nosso estudo também mostrou efeito sinérgico entre CZA e amicacina em isolados de *S. marcescens* com diferentes genes, como  $\beta$ -lactamases, *aac (6')-Ib3* e *ant (2'')-Ia*, como já descrito por Huang *et al.*, 2021 que demonstraram que a combinação de CZA e amicacina teve maior evidência de sinergia contendo o gene *aac (6')-Ib* juntamente com *blaKPC* (137).

A análise das sequências de uma parte dos genes que apresentaram efeito sinérgico ou indiferente nas combinações de antibióticos não evidenciou diferenças ou variações significativas entre os isolados, indicando que mutações não foram responsáveis pelos efeitos observados. Entretanto, estudos sugerem que a expressão gênica pode contribuir para o sinergismo ou indiferença observado (138), (139). Esses achados ressaltam a importância de compreender a expressão gênica e seu papel na resistência aos antibióticos, o que pode ter implicações para o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias para combater a resistência aos antibióticos.

## 7. CONCLUSÕES

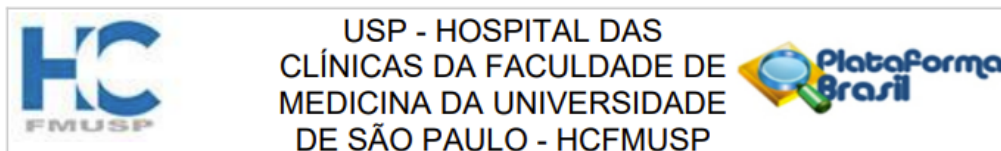
- Efeitos sinérgicos foram observados em várias das combinações de antibióticos testadas, com maior frequência de sinergismo entre amicacina com colistina em isolados de *K. pneumoniae* e amicacina com ceftazidima/avibactam em isolados de *A. baumannii* e *S. marcescens*.
- Foi observado efeito de antagonismo nas combinações de amicacina com colistina e gentamicina com colistina, o que ascende um alerta na necessidade de cuidado na seleção das combinações terapêuticas.
- Ao comparar o teste epsilométrico e o disco aproximação, observou-se que o método epsilométrico teve maior concordância (>90%) com o método padrão ouro. No entanto, suas sensibilidades e especificidades podem variar, sugerindo a necessidade de considerar fatores como custo, disponibilidade e tempo de execução ao escolher o método mais adequado.
- A sensibilidade a um dos antimicrobianos está estatisticamente relacionada ( $p < 0,05$ ) à presença do efeito sinérgico das combinações. Isso indica que a resposta favorável ao tratamento antimicrobiano combinado pode estar diretamente ligada à sensibilidade inicial a pelo menos uma das drogas utilizadas.
- A presença dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, como as metilases do tipo *rtmB* e *rmtG*, e EMAs *aph(3')Ib* e *aac(6')Ib* esteve principalmente associada a níveis mais altos da CIM para amicacina ( $p < 0,05$ ), indicando uma correlação entre a presença desses genes e a resistência aos antibióticos testados.
- A identificação de plasmídeos portadores dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, *aac(3)IIa* e *aph(3')VIa* sugere a possibilidade de transferência horizontal desses genes entre os isolados de *S. marcescens* e *K. pneumoniae*, respectivamente.



- Por fim, a análise da associação entre os genes de resistência e o efeito de sinergismo *in vitro* demonstrou a influência das EMAs produtoras de determinados genes (*aadA1*, *aph(3)Via*, *aph(3')Ib*, *aph(6')Id*), a metilase *rmtB* e as  $\beta$ -lactamases (*blaKPC*, *blaTEM1B* e *blaCTX-M*) na resposta sinérgica entre amicacina e outros antimicrobianos, principalmente quando combinado com meropenem e ceftazidima/avibactam. Essa associação ressalta a importância de avaliar o perfil genético das bactérias para um tratamento eficaz e direcionado.

## 8. ANEXOS

### Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de sinergismo para avaliar a atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos em combinação com outras drogas em bactérias gram-negativas multirresistentes

**Pesquisador:** Anna Sara Shafferman Levin

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 55556322.9.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.283.703

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo descritivo- transversal. A seleção das amostras será feita pelo método não probabilístico, ou seja, por conveniência, e será desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 49 – LIM49 – da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo."

Segundo o "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1866467.pdf" e "Projeto\_detalhado.docx"

"Os microrganismos do estudo são provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e do Hospital Universitário de Londrina, coletados no período 2016-2021, e estão estocadas no banco de cepas do LIM49. Para esse estudo serão selecionados 40 isolados de *K. pneumoniae*, 20 isolados de *Acinetobacter baumannii* e 12 isolados de *Serratia marcescens*. Esses microrganismos foram isolados do sangue, tecido e aspirado traqueal e foram identificados no sistema automatizado Vitek-2 ou Vitek-MS (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA), por PCR ou por sequenciamento de DNA. Para avaliar o sinergismo entre antibióticos serão realizados os seguintes testes: E-test e disco aproximação, que são os métodos mais usados na prática clínica e em estudos de pesquisa. Eles apresentam um ótimo desempenho quando são comparados com o método padrão-ouro e são considerados os métodos mais novos para analisar associação entre os antibióticos. Para os testes de sinergismo serão utilizadas as seguintes combinações: amicacina (AK) e gentamicina (GEN) com os antimicrobianos meropenem (MEM), ceftazidima-avibactam (CAV-AVI) e colistina (COL). A

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## Anexo B – Produção científica

Contents lists available at ScienceDirect

**American Journal of Infection Control**

journal homepage: [www.ajicjournal.org](http://www.ajicjournal.org)

**ELSEVIER** **AIC**

Brief Report

**Disinfection of 3D-printed protective face shield during COVID-19 pandemic**

Saidy Vásconez Nogueira <sup>BB101</sup>, Evelyn Patricia Sánchez Espinoza MD <sup>1</sup>, Marina Farrel Cortes PhD <sup>4</sup>, Izabel Cristina Vilela Oshiro RN <sup>1</sup>, Fernanda de Sousa Spadão RN <sup>1</sup>, Laura Maria Brasileiro Brandão Nurse <sup>1</sup>, Ana Natiele da Silva Barros RN <sup>1</sup>, Sibeli Costa RN <sup>1</sup>, Bianca Leal de Almeida MD <sup>1</sup>, Paula Gemignani Soriano MD <sup>1</sup>, Alessandra Grassi Salles MD <sup>1</sup>, Miriam Elizabete Marques Escorcio MD <sup>1</sup>, Cristina Madeira Barretti MD <sup>1</sup>, Fernanda Spadotto Baptista MD <sup>1</sup>, Glaura Souza Alvarenga MD <sup>1</sup>, Igor Marinho MD <sup>1</sup>, Leila Suemi Harima Letaif MD <sup>1</sup>, Ho Ye Li MD, PhD <sup>1</sup>, Pedro Bacchi MD <sup>1</sup>, Ana Rubia Guedes dos Santos RN <sup>1</sup>, Lucas Borges Regadas Designer <sup>1</sup>, Carlos Eduardo Lima Braga BDes <sup>1</sup>, Fabio Zsigmond BSoe, Sci <sup>1</sup>, Aluisio Cotrim Segurado MD, PhD <sup>1</sup>, Thais Guimaraes MD, PhD <sup>1</sup>, Anna Sara Levin MD, PhD <sup>1</sup>, Cristiane Aun Bertoldi PhD <sup>1</sup>, Luiz Henrique Catalani PhD <sup>1</sup>, Eduardo de Senzi Zancul PhD <sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa MD, PhD <sup>1,2,3,4</sup>

Contents lists available at ScienceDirect

**International Journal of Infectious Diseases**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)

**ELSEVIER** **INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES**

Decontamination and re-use of surgical masks and respirators during the COVID-19 pandemic

Marina Farrel Cortes <sup>1,2,3,4</sup>, Evelyn Patricia Sánchez Espinoza <sup>1</sup>, Saidy Liceth Vásconez Nogueira <sup>1</sup>, Aline Alves Silva <sup>1</sup>, Warren Erik Steffen Araujo de Medeiros <sup>1</sup>, Lucy Santos Villas Boas <sup>1</sup>, Noely Evangelista Ferreira <sup>1</sup>, Tania Regina Tozetto-Mendoza <sup>1</sup>, Fernando Gonçalves Moraes <sup>1</sup>, Rayana Santiago de Queiroz <sup>1</sup>, Adriana Coracini Tonacio de Proenca <sup>1</sup>, Thais Guimaraes <sup>1</sup>, Ana Rubia Guedes <sup>1</sup>, Leila Suemi Harima Letaif <sup>1</sup>, Amanda Cardoso Montal <sup>1</sup>, Maria Cassia Mendes-Correa <sup>1</sup>, Vanderley M. John <sup>1</sup>, Anna S. Levin <sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa <sup>1</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

**BRIEF COMMUNICATION**

http://doi.org/10.1590/S1678-9946202103074

**Are mobile phones part of the chain of transmission of SARS-CoV-2 in hospital settings?**

Evelyn Patricia Sánchez Espinoza<sup>1</sup>, Marina Farrel Cortes<sup>1</sup>, Saidy Vasconez Nogueira<sup>1</sup>, Anderson Vicente de Paula<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1</sup>, Lucy Santos Villas Boas<sup>1</sup>, Marcelo Park<sup>1</sup>, Cristina Carvalho de Silva<sup>1</sup>, Ingra Moraes<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1</sup>, Tania Regina Tozetto-Mendoza<sup>1</sup>, Icaro Bozczowski<sup>1</sup>, Ester Candeira Sabino<sup>1</sup>, Maria Cassia Mendes-Correa<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3,4</sup>

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY **Microbiology Spectrum** RESEARCH ARTICLE

**Multicenter Diagnostic Evaluation of OnSite COVID-19 Rapid Test (CTK Biotech) among Symptomatic Individuals in Brazil and the United Kingdom**

Caitlin R. Thompson<sup>1</sup>, Pablo Muñoz Torres<sup>2</sup>, Konstantina Kontogianni<sup>3</sup>, Rachel L. Byrne<sup>4</sup>, LSTM Diagnostic group, Saidy Vásconez Nogueira<sup>1</sup>, Alessandra Luna-Muschi<sup>1,2,4</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1,2,4</sup>, Pamela S. Andrade<sup>1</sup>, Antonio dos Santos Barboza<sup>1</sup>, Marri Nishikawara<sup>1</sup>, CONDOE steering group, Richard Body<sup>5</sup>, Margaretha de Vos<sup>6</sup>, Camille Escadafal<sup>1</sup>, Emily Adams<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,4</sup>, Ana I. Cubas-Aizenza<sup>1</sup>

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (2023) 42:787–792

<https://doi.org/10.1007/s10096-023-04594-w>

**BRIEF REPORT**

**Chlorhexidine susceptibility and Eagle effect in planktonic cells and biofilm of nosocomial isolates**

Ana Paula Marchi<sup>1,2,4</sup>, Marina Farrel Cortes<sup>1,2</sup>, Saidy Vásconez Nogueira<sup>1,2</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1,4</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,4</sup>, Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1,2</sup>

Contents lists available at ScienceDirect

**Anaerobe**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anaerobe](http://www.elsevier.com/locate/anaerobe)

**ELSEVIER**

Short Communication

**Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Clostridioides difficile* infection: A prospective diagnostic performance study**

Evelyn Santana Girão <sup>1,2,3</sup>, Saidy Liceth Vásconez Nogueira <sup>1</sup>, Evelyn Patricia Sánchez Espinoza <sup>1</sup>, Camila Loredana Pereira Alves Madeira Bezerra <sup>1</sup>, Fernando Molina Lino <sup>1</sup>, Marina Farrel Cortes <sup>1</sup>, Sânia Alves dos Santos <sup>1</sup>, Gláucia Paranhos-Baccala <sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão Neto <sup>1,2,3</sup>, Sílvia Figueiredo Costa <sup>1,2,3</sup>

**antibiotics** **MDPI**

Article

**Virulomic Analysis of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Experimental Virulence Model Using *Danio rerio* (Zebrafish)**

Edson Luiz Tarsia Duarte <sup>1</sup>, Camila Fonseca Rizek <sup>1,2</sup>, Evelyn Sanchez Espinoza <sup>1</sup>, Ana Paula Marchi <sup>1</sup>, Saidy Vasconez Nogueira <sup>1,2</sup>, Marina Farrel Cortes <sup>1</sup>, Bianca H. Ventura Fernandes <sup>1</sup>, Thais Guimaraes <sup>3,4</sup>, Cláudia M. D. de Maio Carrilho <sup>4</sup>, Lauro V. Perdigão Neto <sup>1</sup>, Priscila A. Trindade <sup>5</sup> and Sílvia Figueiredo Costa <sup>1</sup>

The Journal of Infectious Diseases

**BRIEF REPORT**

**Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant Shedding and Predictors of Viral Culture Positivity on Vaccinated Healthcare Workers With Mild Coronavirus Disease 2019**

Alessandra Luna-Muschi<sup>1</sup>, Saidy Vasconez Nogueira<sup>1</sup>, Igor C. Borges<sup>1,2,3</sup>, Anderson V. De Paula<sup>1</sup>, Leonardo Pereira-Correa<sup>1</sup>, Carolina Lacerda<sup>1,2</sup>, Julia Ferreira Masi<sup>1</sup>, Luiza Silva Pereira Guimarães<sup>1,2</sup>, Pablo Monte Torres<sup>1,2</sup>, Nazareno Scaccia<sup>1,2</sup>, Lucy S. Villas Boas<sup>1,2</sup>, Almir Ribeiro da Silva Jr.<sup>1,2</sup>, Pamela S. Andrade<sup>1</sup>, Juliana C. Travençolo<sup>1</sup>, Camille Escadafal<sup>1</sup>, Vitor Falcão de Oliveira<sup>1,2</sup>, Tania R. Tozetto-Mendoza<sup>1</sup>, Maria Cassia Mendes-Correa<sup>1,2,3</sup>, Anna S. Levin<sup>1,2</sup>, Igor C. Borges<sup>1,2</sup> and Sílvia F. Costa<sup>1,2,3</sup>

escape natural and vaccine-induced immunity [1, 2]. Omicron variant may be >10 times more transmissible than ancestral viruses and twice as contagious as the Delta variant [1]. There is scarce data on Omicron shedding, which is an important factor for determination of coronavirus disease 2019 (COVID-19) transmissibility [2]. In this study, we aimed to characterize Omicron shedding duration by comparing viral isolation, rapid antigen test (RAT), and real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) cycle threshold (Ct) values.

**METHODS**

Setting and Study Population  
Healthy healthcare workers (HCWs) from Faculdade de

**ELSEVIER**

**Case Report: Successful Treatment of Recurrent Urinary Tract Infection Due to Extensively Drug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in a Kidney Transplant Recipient Using Chloramphenicol**

Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1,2,3</sup>, Anna Silva Machado<sup>1</sup>, Riberto Garcia da Silva<sup>1</sup>, Ricardo Barbosa Cintra de Souza<sup>1</sup>, Saurus Mayer Coutinho<sup>1</sup>, Florencia Comello<sup>1</sup>, Ana Paula Matos Porto<sup>1</sup>, Daíla Sousa Lima<sup>1</sup>, Thais Sabato Romano di Gioia<sup>1</sup>, Victor Augusto Camarinha Castro Lima<sup>1</sup>, Luis Arthur Brasil Gadelha Farias<sup>1,2</sup>, Mariana Rolim Fernandes Macedo<sup>1</sup>, Saidy Liceth Vásconez Nogueira<sup>1</sup>, Sandra Nascimento dos Anjos<sup>1</sup>, Chayenne Mika Matsumoto Pinto Tonheiro<sup>1</sup>, Bruno César Batista Cocentino<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1</sup>, and Maura Salaroli de Oliveira<sup>1,2,3</sup>

## 9. REFERÊNCIAS

1. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):450–70.
2. Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. *Saudi Med J.* 2017;38(4):444.
3. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trearichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012;55(7):943–50.
4. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119–25.
5. ANVISA AN de VS. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde [Internet]. 2020. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletim-seguranca-do-paciente>
6. Moradigaravand D, Boinett CJ, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Res.* 2016;26(8):1101–9.
7. CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac.” Hospitais Gerais Ano 2020 Controle de Infecção Hospitalar - Brasil. 2020; Available from: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/dados/ih2020\\_dados\\_hospitais\\_gerais.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/dados/ih2020_dados_hospitais_gerais.pdf)
8. Koh Jing Jie A, Hussein M, Rao GG, Li J, Velkov T. Drug Repurposing Approaches towards Defeating Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens: Novel Polymyxin/Non-Antibiotic Combinations. *Pathogens.* 2022;11(12).
9. Liu Y, Tong Z, Shi J, Li R, Upton M, Wang Z. Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. *Theranostics.* 2021;11(10):4910–28.
10. Bhandari V, Suresh A. Next-Generation Approaches Needed to Tackle Antimicrobial Resistance for the Development of Novel Therapies Against the Deadly Pathogens. *Front Pharmacol.* 2022;13(June):1–9.
11. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus.* 2018;8(1).
12. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. *HHS Public Access.* 2017;30(2):523–37.
13. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria : An update. *Drug Resist Updat [Internet].* 2012;15(3):133–48. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.05.001>

14. Vogelman B, Craig WA. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr.* 1986;108(5 PART 2):835–40.
15. Tadi. BJCP. Gentamicin. In: StatPearls [Internet]Pubmed. 2023.
16. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus.* 2018;8(1).
17. Rashighi M, Harris JE. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
18. FDA. U.S. Food and Drug Administration. Aminoglycoside antibiotics. Aminoglycoside risk evaluation and mitigation strategy (REMS). 2018.
19. ANVISA AN de VS. ANVISA. Registro de medicamentos novos. 2021.
20. Tahbaz S V., Azimi L, Lari AR. Characterization of aminoglycoside resistance mechanisms in acinetobacter baumannii isolates from burn wound colonization. *Ann Burns Fire Disasters.* 2019;32(2):115–21.
21. Antibiotics in Laboratory Medicine.
22. FIRMO EF. PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA A AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* PORTADORES DO GENE blaKPC PROVENIENTES DE HOSPITAIS DE RECIFE-PE. 2016;1–105.
23. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. 2013;
24. Paul M, Lador A, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam- aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis ( Review ). 2018;(1).
25. Ristuccia AM, Cunha BA. The aminoglycosides. *Med Clin North Am.* 1982;66(1):303–12.
26. Ristuccia AM, Cunha BA. An overview of amikacin. Vol. 7, *Therapeutic Drug Monitoring.* 1985. p. 12–25.
27. Hancock REW. Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin: II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother.* 1981;8(6):429–45.
28. Pacifici GM. Clinical pharmacology of gentamicin in neonates: regimen, toxicology and pharmacokinetics. *Med Express.* 2015;2(5):1–9.
29. Zhanel GG, Lawson CD, Zelenitsky S, Findlay B, Schweizer F, Adam H, et al. Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(4):459–73.
30. Mathews A, Bailie GR. Clinical Pharmacokinetics, Toxicity and Cost Effectiveness Analysis of Aminoglycosides and Aminoglycoside Dosing Services. *J Clin Pharm Ther.* 1987;12(5):273–91.

31. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9(NOV):1–21.
32. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance : A Review. 2019;10(April).
33. Khan F, Thuy D, Pham N, Kim Y. Alternative strategies for the application of aminoglycoside antibiotics against the biofilm-forming human pathogenic bacteria. 2020;(Davis 1987).
34. Wang N, Luo J, Deng F, Huang Y, Zhou H. Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Front Pharmacol.* 2022;13(February):1–15.
35. Ramirez MS, Tolmasky ME. *NIH Public Access.* 2011;13(6):151–71.
36. Santos I de AL dos;, Mendonça JM da RN, Ribeiro FC. O desafio de inovar. *Rev Bras Análises Clínicas.* 2015;47.
37. Holbrook SYL, Garneau-Tsodikova S. Evaluation of aminoglycoside and carbapenem resistance in a collection of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microb Drug Resist.* 2018;24(7):1020–30.
38. Doi Y, Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007;45(1):88–94.
39. Salimizand H, Zomorodi AR, Mansury D, Khakshoor M, Azizi O, Khodaparast S, et al. Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of *aadA1* and *armA*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2018;66(April):195–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.028>
40. Gordon L, Cloeckert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-albert A, Ganière JP, et al. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid *pAB5S9* from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1):65–71.
41. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist.* 2013;19(2):94–9.
42. Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4443–51.
43. Dayanand K, Olivia E. Atherton<sup>1</sup>, Jennifer L. Tackett<sup>2</sup>, Emilio Ferrer<sup>1</sup> and RWR. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav* [Internet]. 2018;176(5):139–48. Available from: <http://europepmc.org/backend/ptpmrender.fcgi?accid=PMC5604322&blobtype=>

pdf

44. Gutmann L, Gutmann L. Antibacterial activity of meropenem against gram-negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 1989;24:125–32.
45. Mackay B, Parcell BJ, Shirran SL, Coote PJ. Carbapenem-Only Combination Therapy against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of In Vitro and In Vivo Efficacy and Mode of Action. *Antibiotics.* 2022;11(11).
46. García-Salguero C, Rodríguez-Avial I, Picazo JJ, Culebras E. Can plazomicin alone or in combination be a therapeutic option against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*? *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5959–66.
47. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):281.
48. de Maio Carrillho CMD, Gaudereto JJ, Martins RCR, de Castro Lima VAC, de Oliveira LM, Urbano MR, et al. Colistin-resistant Enterobacteriaceae infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017;87(3):253–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.007>
49. Ribeiro AC da S, Chikhani YC dos SA, Valiatti TB, Valêncio A, Kurihara MNL, Santos FF, et al. In Vitro and In Vivo Synergism of Fosfomicin in Combination with Meropenem or Polymyxin B against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Antibiotics.* 2023;12(2).
50. Chen K, Chan EWC, Xie M, Ye L, Dong N, Chen S. Widespread distribution of mcr-1-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016. *Eurosurveillance.* 2017;22(39):1–11.
51. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;22:18–27.
52. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in  $\beta$ -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6248–55.
53. Shields RK, Nguyen MH, Chen L, Press EG, Potoski BA, Marini R V., et al. Ceftazidime-avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(8):1–7.
54. Lahiri SD, Walkup GK, Whiteaker JD, Palmer T, McCormack K, Angela Tanudra M, et al. Selection and molecular characterization of ceftazidime/avibactam-resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa* strains containing derepressed AmpC. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(6):1650–8.
55. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5104–11.

56. Schmid A, Wolfensberger A, Nemeth J, Schreiber PW, Sax H, Kuster SP. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-51711-x>
57. Kumar A, Safdar N, Kethireddy S, Chateau D. A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: A meta-analytic/meta-regression study. *Crit Care Med*. 2010;38(8):1651–64.
58. Pneumonia H. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388–416.
59. Clark RB, Pakiz CB, Hostetter MK. Synergistic activity of aminoglycoside-beta-lactam combinations against *Pseudomonas aeruginosa* with an unusual aminoglycoside antibiogram. *Med Microbiol Immunol*. 1990;179(2):77–86.
60. Moland ES, Craft DW, Hong S, Kim S, Hachmeister L, Sayed SD, et al. In Vitro Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* and Selection of Tigecycline-Amikacin Synergy □. 2008;52(8):2940–2.
61. Leite GC, Oliveira MS, Vieira L, Kamia C, Rocha D, Guimar T, et al. Antimicrobial Combinations against Pan- Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. 2016;1–16.
62. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, Laplante KL. *Id Week* 2015. 2017;2(September):2633851.
63. Xu Z, Xu X, Yang L, Li B, Li L, Li X, et al. *SC. Microb Pathog* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.053>
64. 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*. 2010;54(12):5316–22.
65. Juliana Januário Gaudereto A, Lauro Vieira Perdigão Neto, a Gleice Cristina Leite, a Roberta Ruedas Martins, a Gladys Villas Boas do Prado, a Flavia Rossi, b Thais Guimarães, c Anna Sara Levin a SFC. crossm Synergistic Effect of Ceftazidime-Avibactam with Meropenem. 2019;63(5):1–6.
66. Chusri S. Synergistic Antibacterial Effects of Meropenem in Combination with Aminoglycosides against Carbapenem-Resistant. 2021;
67. Ontong JC, Ozioma NF, Voravuthikunchai SP, Chusri S. Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside , and piperacillin on multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. 2021;1–18.
68. Rigatto MH, Vieira FJ, Antochewis LC, Behle TF, Lopes NT, Zavascki P. Polymyxin B in Combination with Antimicrobials Lacking In Vitro Activity versus Polymyxin B in Monotherapy in Critically Ill Patients with *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* Infections. 2015;59(10):6575–80.
69. Perdigão L, Oliveira MS, Ruedas R, Marchi AP, Janua J, Auxil L, et al.



- Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms : synergy with meropenem. 2019;(October 2018):177–81.
70. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin Microbiol Infect*. 2022;28(4):521–47.
  71. Marcus R, Paul M, Elphick H, Leibovici L. Clinical implications of  $\beta$ -lactam-aminoglycoside synergism: Systematic review of randomised trials. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011;37(6):491–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.029>
  72. Kiffer CR V, Sampaio JLM, Sinto S, Oplustil CP, Koga PCM, Arruda C, et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. 2005;52:317–22.
  73. Guelfi KC, Tognim MCB, Cardoso CL, Gales AC, Garcia LB, Tognim MCB, et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Meropenem in Combination with Polymyxin B and Gatifloxacin Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Meropenem in Combination with P. 2013;9478(April 2016).
  74. Pia M, Piccoli L, Mingoia M, Marchetti F, Emanuele P. Synergistic potential of ceftazidime plus amikacin or levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* as determined using a checkerboard and a disk diffusion technique. 2005;53:157–60.
  75. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. 2005;43(1):140–3.
  76. Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. In vitro Synergy and Time-kill Assessment of Interaction between Kanamycin and Metronidazole against Resistant Bacteria. 2015;14(May):837–43.
  77. Clinical Microbiology Procedures Handbook - Google Libros.
  78. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, et al. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8):1–10.
  79. Sueke H, Kaye SB, Neal T, Hall A, Tuft S, Parry CM. An in vitro investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(8):4151–5.
  80. Bonapace CR, White RL, Friedrich L V., Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: A comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(1):43–50.
  81. Odds FC. Synergy , antagonism , and what the chequerboard puts between them.

- 2003;(June):273144.
82. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA, Carolina S, Carolina S. Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy : Time-Kill , Checkerboard , and E test. 1996;40(8):1914–8.
  83. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing : A Review of General Principles and Contemporary Practices AND THE RATIONALE FOR PERFORMING. 2009;7750:1749–55.
  84. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. Am Soc Microbiol [Internet]. 2016;(December 2009):1–13. Available from: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
  85. Bakken JS, Street S. Clinical Infectious Diseases Advance Access published February 13, 2014 0 MONTH. 2014;2014.
  86. Mubin Kazi, Rukhsar Khot, Anjali Shetty CR. Indian Journal of Medical Microbiology. Ind. 2018;36(3):369–75.
  87. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. 2006;(January):573–6.
  88. Rodriguez CH, Ambrosio A De, Bajuk M, Spinozzi M, Bombicino K, Radice M, et al. Brief Original Article In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. (Imi):2–5.
  89. Services H. Guidance for Industry and FDA Class II Special Controls Guidance Document : Antimicrobial Susceptibility Test ( AST ) Systems Preface Public Comment : Additional Copies : 2009;1–42.
  90. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing. An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. Vol. 33, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. 1–35 p. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
  91. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1355–61.
  92. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020;75(12):3491–500.
  93. Carattoli A, Zankari E, Garcíá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3895–903.
  94. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA BB.

- Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000;10(3):14–6.
95. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–10.
  96. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745–7.
  97. Nichols WW, De Jonge BLM, Kazmierczak KM, Karlowsky JA, Sahn DF. In vitro susceptibility of global surveillance isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime-avibactam (INFORM 2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):4743–9.
  98. Higashino HR, Marchi AP, Martins RCR, Carvalho LB, Neto LVP, Côrtes MF, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection is associated with lower overall survival in a cohort of haematopoietic stem-cell transplantation patients: Mechanism of resistance and virulence by whole-genome sequencing. *J Med Microbiol*. 2021;70(10).
  99. BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2019;1–65. Available from: <http://brcast.org.br/>
  100. Stone ND, O’Hara CM, Williams PP, McGowan JE, Tenover FC. Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for unusual species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):340–6.
  101. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol*. 1991;29(3):533–8.
  102. van der Heijden IM, Levin AS, De Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, et al. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007;6:8.
  103. Lo-Ten-Foe JR, De Smet AMGA, Diederer BMW, Kluytmans JAJW, Van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3726–30.
  104. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(5):546–51.
  105. Costello SE, Deshpande LM, Davis AP, Mendes RE, Castanheira M. Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2019;16:278–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.020>

106. Abo-State MAM, Saleh YE-S, Ghareeb HM. Prevalence and sequence of aminoglycosides modifying enzymes genes among *E.coli* and *Klebsiella* species isolated from Egyptian hospitals. *J Radiat Res Appl Sci* [Internet]. 2018;11(4):408–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.08.005>
107. Zhu X, Sun C, Chen H, Zhan X, Liu C, Liu X, et al. Co-occurrence of three different plasmids in an extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate causing urinary tract infection. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020;23:203–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.002>
108. Thompson CR, Muñoz Torres P, Kontogianni K, Benguey D, Byrne RL, Noguera SV, et al. Multicentre diagnostic evaluation of OnSite COVID-19 Rapid Test (CTK Biotech) among symptomatic individuals in Brazil and The United Kingdom. *medRxiv* [Internet]. 2022 Jan 1;2022.09.12.22279847. Available from: <http://medrxiv.org/content/early/2022/09/12/2022.09.12.22279847.abstract>
109. Dalia-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3403–6.
110. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014;79(4):468–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006>
111. Hamidian M, Ambrose SJ, Hall RM. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *strAB* streptomycin resistance genes. *Plasmid* [Internet]. 2016;87–88:43–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2016.09.001>
112. Khongfak S, Thummeepak R, Leungtongkam U, Tasanapak K, Thanwisai A, Sitthisak S. Insights into mobile genetic elements and the role of conjugative plasmid in transferring aminoglycoside resistance in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* AB329. *PeerJ*. 2022;10.
113. Gür D, Hasdemir U, Çakar A, Çavuşoğlu İ, Çelik T, Aksu B. Comparative in vitro activity of plazomicin and older aminoglycosides against Enterobacterales isolates; prevalence of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methyltransferases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;97(4).
114. Chamary J V., Hurst LD. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome Biol*. 2005;6(9).
115. Elshamy AA, Saleh SE, Aboshanab KM, Aboulwafa MM, Hassouna NA. VI genes from *Klebsiella pneumoniae* conferring phenotypic carbapenem resistance in *E. coli*. 2023;
116. García DC, Catalano M, Piñeiro S, Woloj M, Kaufman S, Sordelli DO. The emergence of resistance to amikacin in *Serratia marcescens* isolates from patients

- with nosocomial infection. *Int J Antimicrob Agents*. 1996;7(3):203–10.
117. Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among acinetobacter baumannii and pseudomonas aeruginosa isolates. *Microb Drug Resist*. 2013;19(4):282–8.
  118. Shaw KJ, Rather PN, Sabatelli FJ, Mann P, Munayyer H, Mierzwa R, et al. Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(7):1447–55.
  119. Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A, Morales-Espinosa R. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front Microbiol*. 2018;9(MAY):1–16.
  120. Kabins SA. Interactions Among Antibiotics and Other Drugs. *JAMA J Am Med Assoc*. 1972;219(2):206–12.
  121. Mantzana P, Protonotariou E, Kassomenaki A, Meletis G, Tychala A, Keskilidou E, et al. In Vitro Synergistic Activity of Antimicrobial Combinations against Carbapenem- and Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics*. 2023;12(1).
  122. Liu E, Jia P, Li X, Zhou M, Kudinha T, Wu C, et al. In vitro and in vivo effect of antimicrobial agent combinations against carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* with different resistance mechanisms in China. *Infect Drug Resist*. 2021;14:917–28.
  123. Kulengowski B, Rutter WC, Champion JJ, Lee GC, Feola DJ, Burgess DS. Effect of increasing meropenem MIC on the killing activity of meropenem in combination with amikacin or polymyxin B against MBL- and KPC-producing *Enterobacter cloacae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018;92(3):262–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.013>
  124. Almutairi MM. Synergistic activities of colistin combined with other antimicrobial agents against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(7 July):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0270908>
  125. Chen T, Xu W, Yu K, Zeng W, Xu C, Cao J, et al. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam Alone and in Combination with Amikacin against Colistin-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Microb Drug Resist*. 2021;27(3):401–9.
  126. Singkham-in U, Chatsuwat T. In vitro activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin, or fosfomycin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018;91(2):169–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.008>
  127. Gaudereto JJ, Neto LVP, Leite GC, Espinoza EPS, Martins RCR, Villas Boa Prado G, et al. Comparison of methods for the detection of in vitro synergy in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):1–7.

128. Barth N, Ribeiro VB, Zavasckid AP. In vitro activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem, or tigecycline against KPC-2-producing Enterobacteriaceae with high MICs for these antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3596–7.
129. Betts JW, Phee LM, Hornsey M, Woodford N, Wareham DW. In vitro and in vivo activities of tigecycline-colistin combination therapies against carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3541–6.
130. Singh N, Yeh PJ. Suppressive drug combinations and their potential to combat antibiotic resistance. *J Antibiot (Tokyo).* 2017;70(11):1033–42.
131. Prado G, Mendes ET, Martins RCR, Perdigão-Neto LV, Freire MP, Marchi AP, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. *Int J Antimicrob Agents.* 2022;59(1).
132. Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:255–61.
133. Bush K, Bradford PA. Bush and Bradford - 2016 -  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors An Overview.pdf. *Cold Spring Harb Perspect Medicine.* 2016;(Table 1):22.
134. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis.* 2014;59(Suppl 2):S71–5.
135. Both A, Büttner H, Huang J, Perbandt M, Campos CB, Christner M, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(9):2483–8.
136. Sharma S, Banerjee T, Yadav G, Kumar A. Susceptibility profile of bla OXA-23 and metallo- $\beta$ -lactamases co-harboring isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) against standard drugs and combinations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;12(January):1–12.
137. Huang Y, Rana AP, Wenzler E, Ozer EA, Krapp F, Bulitta B, et al. Aminoglycoside-resistance gene signatures are predictive of aminoglycoside MICs for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. 2021;1–8.
138. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia.* 1996;12(1):9–16.
139. Fajardo A, Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(2):161–7.