

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMICACINA E POLIMIXINA B ISOLADAMENTE
E COMBINADOS COM IMPENEM FRENTE A ISOLADOS DE *P. aeruginosa*
RESISTENTES A CARBAPENÊMICO**

CAMILA MÖRSCHBÄCHER WILHELM

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMICACINA E POLIMIXINA B ISOLADAMENTE
E COMBINADOS COM IMIPENEM FRENTE A ISOLADOS DE *P. aeruginosa*
RESISTENTES A CARBAPENÊMICO**

CAMILA MÖRSCHBÄCHER WILHELM

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Andreza F.
Martins

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Mörschbacher Wilhelm, Camila
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMICACINA E POLIMIXINA
B ISOLADAMENTE E COMBINADOS COM IMIPENEM FRENTE A
ISOLADOS DE P. aeruginosa RESISTENTES A
CARBAPENÊMICO / Camila Mörschbacher Wilhelm. -- 2017.
76 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.
Coorientador: Andreza Francisco Martins.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Microbiologia. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3.
Time-kill. I. Barth, Afonso Luis, orient. II.
Francisco Martins, Andreza, coorient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Alexandre Prehn Zavascki

Maria Helena Rigatto

Alexandre Meneghello Fuentefria

Leandro Reus Rodrigues Perez

Agradecimento ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)/HCPA e ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração desta dissertação.

*Para minha mãe, Marieta
Mörschbacher Wilhelm, e meu pai,
Luiz Irineu Wilhelm (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família, especialmente a minha mãe e a meu pai, que sempre me incentivaram a estudar, me apoiaram e priorizaram a minha educação.

Agradeço enormemente aos meus orientadores Afonso Barth e Andreza Martins, que acreditaram em mim e me acolheram, pela orientação e ensinamentos durante este trabalho.

Agradeço as colegas Luciana Nunes, Natália Barth, Daiana Morales e Franciele Rozales, do LABRESIS, que me ajudaram em algumas etapas dos experimentos, assim como a Zélia e as ICs Marina, Amanda e Taíse.

Agradeço ao Laboratório Exame, especialmente a Dra. Jussara Castelan e as colegas Nathália Feltes e Liege dos Santos, pela compreensão e flexibilidade, a todos os colegas do setor de microbiologia do HCPA pelo incentivo a ingressar no mestrado e ao Laboratório Alfa pela compreensão na reta final desta jornada.

Agradeço às amigas Keila Abreu, Maiara Oberherr e Bruna Martins pela presença ao longo dessa caminhada, pelo carinho, apoio, risadas e choros, que, mesmo talvez sem saberem, foram muito importantes, às vezes por simples momentos de distração. Agradeço também às parcerias muito queridas Jéssica Meyer, Pauline Maiara, Natália Poletti, Juliana Caprara e Maiara Carneiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, acadêmica ou pessoalmente, durante este caminho.

“Nada na vida é para ser temido, é apenas para ser compreendido. Agora é a hora de compreender mais, para que possamos temer menos”.

Marie Curie

RESUMO

Base teórica: Devido à diminuição do desenvolvimento de novos antimicrobianos nas últimas décadas, terapias combinadas têm sido empregadas contra bactérias multirresistentes como opção à monoterapia no tratamento de infecções graves. Para tratar infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, amicacina e polimixina B têm sido utilizadas em associações com imipenem, pois possuem diferentes mecanismos de ação, o que, teoricamente, indicaria a possibilidade de efeito sinérgico.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi verificar a interação, *in vitro*, de amicacina e polimixina B em associação com imipenem frente a diferentes isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmico.

Métodos: Foram selecionados isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmico oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, coletados no período de janeiro a março de 2015. Foi realizada eletroforese em gel de campo pulsado e detecção do gene *bla*_{SPM-1} para selecionar diferentes clones. Seis isolados (três SPM-1 positivos e três negativos para a carbapenemase) foram selecionados para realização da técnica de *time-kill*, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana das combinações de imipenem com amicacina e imipenem com polimixina B.

Resultados: Sinergismo ocorreu para combinações de imipenem com amicacina em 3 isolados, dos quais um era SPM-1 positivo e dois eram SPM-1 negativos e todos apresentaram CIMs relativamente baixas a intermediárias. Quanto às combinações de imipenem com polimixina B, houve sinergismo somente para dois isolados, um SPM-1 positivo e um SPM-1 negativo, contudo houve antagonismo em 5 isolados, dois SPM-1 positivos e três SPM-1 negativos. Para 4 isolados, as combinações de imipenem com amicacina tiveram atividade bactericida, enquanto, para todos os isolados, as combinações de imipenem com polimixina B, bem como polimixina B isoladamente, 1x e 2x a CIM apresentaram atividade bactericida.

Conclusão: Sinergismo pode ocorrer, para combinações de imipenem mais amicacina, quando os isolados apresentam CIMs relativamente baixas ou intermediárias para imipenem (≤ 16 $\mu\text{g/mL}$ a 128 $\mu\text{g/mL}$) e amicacina (≤ 32 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, antagonismo aconteceu independentemente de valores altos ou baixos

de concentrações inibitórias mínimas para imipenem e polimixina B. Além disso, a presença ou ausência do gene *bla*_{SPM-1} não pareceu influenciar nos resultados.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, imipenem, amicacina, polimixina B, *time-kill*.

ABSTRACT

Background: Due to a decrease on new antibiotic development over the last decades, combined therapies have been employed against multigrug-resistant bacteria as an option to monotherapy in severe infection treatment. In order to treat infections caused by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*, amikacin and polymyxin B have been used in associations with imipenem, because they possess different mechanisms of action, which could, theoretically, indicate the possibility of synergistic effect.

Objective: The aim of this study was to verify the interaction, *in vitro*, of amikacin and polymyxin B in association with imipenem against various carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates.

Methods: Carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates have been selected from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, collected from January to March 2015. Pulsed field gel electrophoresis and detection of *bla*_{SPM-1} gene has been performed to select different clones. Six isolates (three SPM-1 positive and three negative for the carbapenemase) were selected for time-kill assay, in order to assess antimicrobial activity of imipenem plus amikacin and imipenem plus polymyxin B combinations.

Results: Synergism occurred for combinations of imipenem plus amikacin in three isolates, from which one was SPM-1 positive and two were SPM-1 negative, and all presented relatively low to intermediate minimum inhibitory concentrations. About imipenem plus polymyxin B combinations, synergism occurred in only two isolates, one SPM-1 positive and one SPM-1 negative, however antagonism occurred in five isolates, two SPM-1 positive and three SPM-1 negative. For 4 isolates, imipenem plus amikacin combinations had bactericidal effect, while, for all isolates, combinations of imipenem plus 1x and 2x the MIC of polymyxin B presented bactericidal activity.

Conclusions: Synergism can occur, for imipenem plus amikacin combinations, when isolates present relatively low or intermediate MIC of imipenem (≤ 16 $\mu\text{g/mL}$ to 128 $\mu\text{g/mL}$) and amikacin (≤ 32 $\mu\text{g/mL}$). However, antagonism happened regardless high or low minimum inhibitory concentrations for imipenem and polymyxin B. Also, the presence or absence of *bla*_{SPM-1} gene did not seem to influence the results.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, imipenem, amikacin, polymyxin B, time-kill.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégias de busca de informações.	9
Figura 2. Classes de antimicrobianos relacionados aos sítios de ação na célula bacteriana.....	12
Figura 3. Técnica com fitas de Etest®.....	20
Figura 4. Exemplo de uma placa com antimicrobianos combinados.....	21

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Time-kill curves	44
----------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificações de beta-lactamases encontradas em <i>P. aeruginosa</i>	16
---	----

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Characteristics of the isolates selected for time-kill assay and concentrations tested.	40
Table 2. Log ₁₀ UFC/mL changes between AKN combinations and the most active single antibiotic after 24 hours exposure.	45
Table 3. Log ₁₀ UFC/mL changes between PB combinations and the most active single antibiotic after 24 hours exposure.	45
Table 4. Log ₁₀ UFC/mL changes between AKN final inoculum and initial inoculum after 24 hours exposure.	46
Table 5. Log ₁₀ UFC/mL changes between PB final inoculum and initial inoculum after 24 hours exposure.	46
Table 1. Log ₁₀ UFC/mL changes between combination and the most active single antimicrobial.	57
Table 2. Log ₁₀ UFC/mL changes between times and its respective initial inoculum for amikacin.	58
Table 3. Log ₁₀ UFC/mL changes between times and its respective initial inoculum for polymyxin B.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FC	Fibrose cística
MDR	Multirresistente a antimicrobianos, do inglês <i>multidrug-resistant</i> .
CIM	Concentração inibitória mínima
CK	<i>Checkerboard</i>
TK	Tempo-morte, do inglês <i>time-kill</i>
HFIM	Modelo de infecção <i>hollow fiber</i> , do inglês <i>hollow fiber infection model</i>
PBP	Proteína ligadora de penicilina, do inglês <i>penicillin binding protein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metalo-beta-lactamase
FIC	Concentração inibitória fracionada, do inglês <i>fractional inhibitory concentration</i>
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada, do inglês <i>fractional inhibitory concentration index</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
PFGE	Eletroforese de campo pulsado, do inglês <i>pulsed field gel electrophoresis</i>

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES ..	9
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.3. MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS	11
2.3.1. IMIPENEM	12
2.3.2. AMICACINA.....	13
2.3.3. POLIMIXINA B.....	13
2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	14
2.4.1. PERDA OU ALTERAÇÃO DE PORINAS	14
2.4.2. BOMBAS DE EFLUXO.....	15
2.4.3. DEGRADAÇÃO OU MODIFICAÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO ...	15
2.4.4. ALTERAÇÃO ESTRUTURAL NA MEMBRANA CELULAR.....	17
2.4.5. ALTERAÇÃO DO SÍTIO ALVO	18
2.5. TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>P. aeruginosa</i>	18
2.6. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
2.7. ESTUDOS DE SINERGISMO EM <i>P. aeruginosa</i>	23
3. MARCO TEÓRICO	25
4. JUSTIFICATIVA.....	26
5. OBJETIVOS.....	27
5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO	27
5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	27

6. REFERÊNCIAS.....	28
7. ARTIGO	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
ANEXOS	62
ANEXO I	62

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um dos mais frequentes patógenos oportunistas, podendo causar infecções nos tratos respiratório e genito-urinário, além de ceratite, otite média, pneumonia, bacteremia e estar relacionada à progressão da doença respiratória da fibrose cística (FC) (1, 2). Infecções causadas por *P. aeruginosa* também estão associadas à permanência hospitalar mais prolongada e a altas taxas de morbidade e mortalidade (3). Desta forma, seu isolamento em pacientes imunocomprometidos, hospitalizados ou portadores de fibrose cística é preocupante, especialmente quando cepas multirresistentes a antimicrobianos (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) são identificadas.

Esse patógeno é naturalmente resistente a diversos antimicrobianos, como ampicilina, cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações e ertapenem, entre outros. Assim, os fármacos geralmente empregados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* são algumas penicilinas, cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, monobactâmicos, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (1, 4).

Apesar de haver antimicrobianos com ação contra *P. aeruginosa*, existem cepas capazes de inativá-los através de variados mecanismos de resistência, como a produção de beta-lactamases (principalmente carbapenemases), alterações dos canais de porina de membrana e da hiperexpressão das bombas de efluxo (4). Já foi descrito que cepas isoladas de amostras clínicas apresentam pelo menos um mecanismo de resistência, o que dificulta o tratamento (2, 5-10). Apesar de não haver um consenso internacional, considera-se *P. aeruginosa* MDR quando esta apresenta resistência a pelo menos dois ou três de cinco classes (penicilinas anti-pseudomonas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) de antimicrobianos (3).

Considerada como tratamento de última linha, as polimixinas são frequentemente usadas em infecções por *P. aeruginosa* MDR, já que esse patógeno é geralmente sensível a esses fármacos. O uso dessa classe havia sido abandonado na década de 70 devido ao desenvolvimento de nefrotoxicidade e neurotoxicidade (11-13).

Tendo em vista a diminuição no desenvolvimento de novos antimicrobianos nas últimas décadas, a emergência de cepas resistentes a praticamente todos os antimicrobianos, inclusive polimixinas, torna-se necessário encontrar outras opções terapêuticas (13). Assim, estudos têm avaliado o sinergismo *in vitro* de dois ou mais antimicrobianos combinados para diversos microrganismos MDR, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterobactérias, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. As combinações comumente testadas contra Gram negativos MDR envolvem carbapenêmicos, polimixina B, tigeciclina, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e fosfomicina entre outros. Contra *P. aeruginosa*, existem poucos estudos recentes avaliando combinações de carbapenêmicos com algum outro antimicrobiano, especialmente aminoglicosídeos e polimixina B, buscando, além de um potencial efeito sinérgico, uma possível diminuição das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) necessárias para o tratamento (14-18).

As técnicas *in vitro* disponíveis para avaliação de sinergismo de antimicrobianos são *checkerboard* (CK), método com fitas de Etest®, método de avaliação das curvas de tempo-morte (TK, do inglês *time-kill*) e o modelo de infecção *hollow fiber* (HFIM, do inglês *hollow fiber infection model*). O método de TK avalia a extensão da atividade bactericida, enquanto as duas primeiras metodologias refletem a CIM. Já o HFIM é o modelo que mais se aproxima a um modelo *in vivo*, pois leva em conta, ao contrário das demais, a farmacocinética, contudo essa técnica é mais complexa e tem um custo maior. Desta forma, a técnica de TK poderia fornecer informações importantes a respeito da interação entre os antimicrobianos e servir como triagem para selecionar cepas e antimicrobianos para serem testados pelo HFIM (19, 20).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Considerando o enfoque deste trabalho, a estratégia de busca de dados foi realizada em bases de dados, como PubMed, LILACS e SciELO, em livros de microbiologia e sites de organizações ligadas à área de microbiologia. Os termos buscados, de forma separada e combinada, foram “*Pseudomonas aeruginosa*”, “synergism”, “polymyxin B”, “amikacin”, “imipenem”, “antimicrobial combined therapy” e “time-kill”, além de suas variações em português. Foi dada preferência às publicações dos últimos dez anos, mas publicações mais antigas com determinações de conceitos e consideradas relevantes para a área também foram avaliadas.

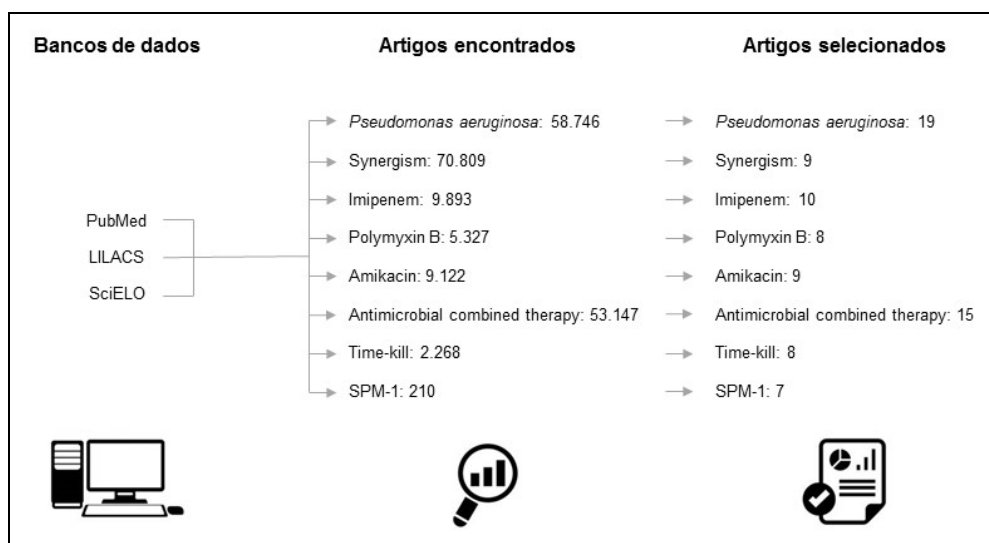


Figura 1. Estratégias de busca de informações.

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria que se apresenta como bacilo Gram negativo, reto ou ligeiramente curvo, geralmente disposto aos pares, medindo de 0,5 a 1,0 µm de largura e 1,5 a 5,0 µm de comprimento. Por utilizar o oxigênio como aceptor final de elétrons durante a respiração aeróbica, *P. aeruginosa* é

descrita como aeróbio estrito. Contudo, pode crescer de forma anaeróbia ao utilizar nitrato ou arginina como aceptores alternativos de elétrons. Uma característica importante é a presença da enzima citocromo oxidase, detectada em testes rápidos para a diferenciação de enterobactérias e outros bacilos Gram negativos não fermentadores (21).

Possui um grande genoma, tipicamente com mais de 6 Mb (22), sendo um microrganismo ubíquo, bastante versátil, encontrado em água, solo e, de forma mais preocupante, em ambientes hospitalares. Alguns estudos de tipagem molecular têm evidenciado que as cepas de *P. aeruginosa* encontradas em amostras clínicas são as mesmas de ambiente hospitalar. Além disso, devido ao sistema de manejo de resíduos clínico-hospitalares, essas cepas também são encontradas no meio ambiente e em sistemas de distribuição de água doméstica. O contato humano com estes ambientes propaga a disseminação dessas cepas clínicas que geralmente apresentam maior virulência e resistência a antimicrobianos (23-26).

Esse microrganismo possui diversos fatores de virulência que o tornam patogênico. Entre esses fatores está o sistema de secreção do tipo III que secreta potentes citotoxinas diretamente nas células hospedeiras. Outros fatores são os pigmentos (sideróforos) que permitem a bactéria escapar do sistema imune inato. Além disso, essa espécie também é capaz de formar biofilmes, aumentando ainda mais a resistência a antimicrobianos (27-29).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista, afetando principalmente imunocomprometidos, como pacientes com FC, queimados e neutropênicos. Em FC, uma doença crônica, essa bactéria tem grande importância, pois está associada com a progressão da doença pulmonar, levando o paciente à falha respiratória e, conseqüentemente, à morte (30, 31). Os pacientes fibrocísticos apresentam alteração no transporte de proteínas, resultando na produção de um muco viscoso notoriamente na via respiratória. Essa característica torna o paciente fibrocístico mais suscetível a infecções da via aérea, o que os leva a um uso prolongado de antibióticos. Essa situação pode levar a uma seleção de cepas resistentes, tornando ainda mais difícil controlar a infecção das vias aéreas dos pacientes com FC (32).

Diversos estudos demonstram infecções nosocomiais causadas por *P. aeruginosa*, de forma mais preocupante por cepas MDR, associadas à

neutropenia aguda, feridas cirúrgicas, queimaduras, trato urinário, aspirado brônquico, lesões de pele, sangue, abscessos, aspirado traqueal, escarro, fluido peritoneal e outros (2, 5, 10, 33-36). Adicionalmente, estudos retrospectivos têm mostrado mortalidade aumentada após tratamento empírico inapropriado para bacteremias por *P. aeruginosa* (37-40). Os fatores de risco associados à mortalidade devido à infecção por essa bactéria são tratamentos impróprios empíricos e demora na aplicação da terapia (3).

2.3. MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos têm como alvo alguma estrutura bacteriana, podendo interferir na parede ou membranas celulares, na função dos ribossomos, nos ácidos nucleicos e no metabolismo. Desta forma, os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são: inibição da síntese da parede celular, disfunção da membrana celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de DNA e RNA e ação antimetabólica (41) (Figura 2).

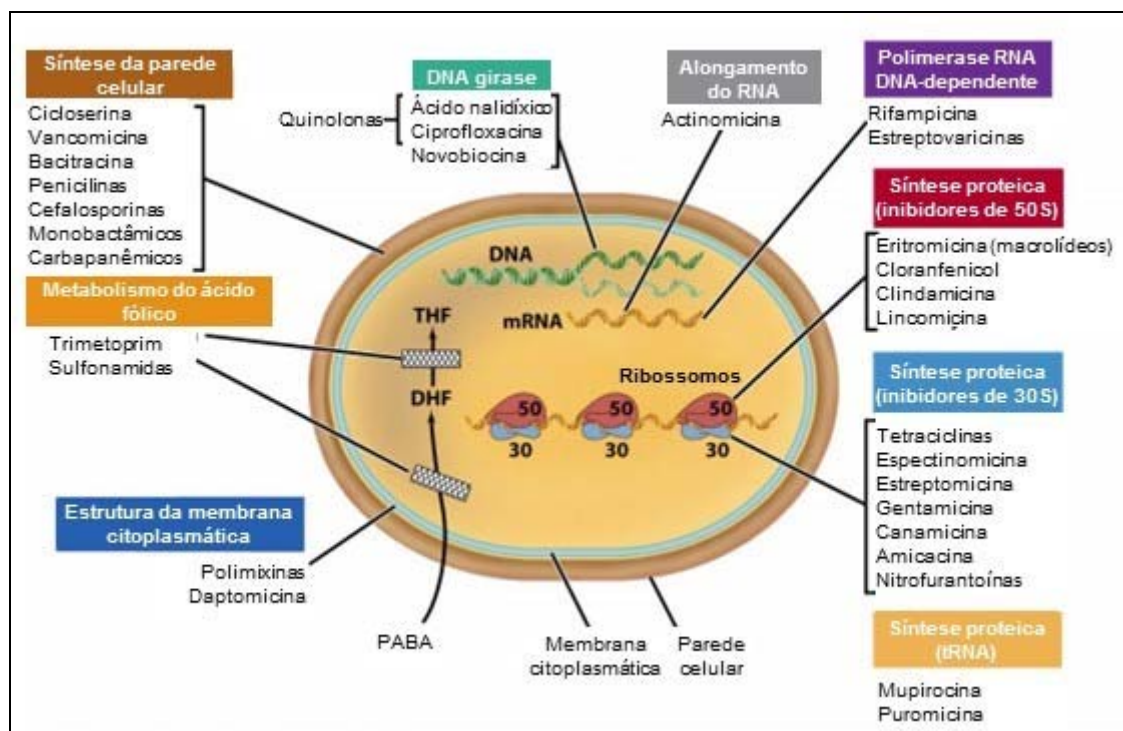


Figura 2. Classes de antimicrobianos relacionados aos sítios de ação na célula bacteriana.

Fonte: Adaptado de Bbosa et al. (2014) (41).

A seguir serão focados os mecanismos de ação dos antimicrobianos aplicados neste estudo.

2.3.1. IMIPENEM

Os carbapenêmicos possuem um anel beta-lactâmico, assim como penicilinas e cefalosporinas, mas também têm modificações em sua estrutura molecular que os tornam mais estáveis e resistentes a beta-lactamases (42). Primeiramente, para agirem, os carbapenêmicos atravessam a membrana celular através de porinas. Após, a molécula liga-se às proteínas ligadoras de penicilina (PBP, do inglês *penicillin binding protein*), que são enzimas que catalisam a formação do peptidoglicano na parede bacteriana. Ao fazer essa ligação, a molécula antimicrobiana inibe as ligações cruzadas e outras reações da biossíntese da parede celular. Como a formação da parede é um processo de formação e autólise ocorrendo ao mesmo tempo, ao inibir as PBPs, apenas a autólise continua. Essa situação leva a respostas de estresse celular e, por fim, resulta na lise da célula bacteriana devido à alta pressão osmótica interna da célula. O principal ponto da

eficácia dos carbapenêmicos é a sua habilidade de se ligar a diversas PBPs (29, 42).

2.3.2. AMICACINA

Os aminoglicosídeos consistem de amino-açúcares conectados tipicamente por pontes glicosídicas. Primeiramente o antimicrobiano precisa passar a membrana da célula bacteriana. Para isso, ocorre uma interação eletrostática entre a molécula de aminoglicosídeo positivamente carregada e o lipopolissacarídeo (LPS) negativamente carregado da membrana externa. Após, por mecanismos relacionados à cadeia de transporte de elétrons não muito bem elucidados, o antimicrobiano entra na célula. O hidroxil e o grupo amino dessas moléculas interagem com a subunidade ribossomal 30S, mais comumente o sítio A, provocando uma mudança conformacional. Esta mudança implica em tradução e síntese de proteínas defeituosas. A morte da bactéria pode ser devido à inserção de proteínas defeituosas traduzidas na membrana, que podem causar desestabilização, ou devido ao fato do antimicrobiano inibir completamente a atividade ribossomal. A amicacina possui uma cadeia lateral L-hidroxiaminobutiramida que bloqueia muitas enzimas N-acetiltransferases e O-fosfotransferases, o que aumenta o seu espectro em relação aos outros fármacos dessa classe (29, 43).

2.3.3. POLIMIXINA B

A classe das polimixinas consiste de cinco polimixinas (A a E), mas somente duas formas estão disponíveis para uso clínico, a colistina (polimixina E) e a polimixina B, tendo esta última sido desenvolvida com o objetivo de ser menos tóxica (29, 44). As polimixinas são peptídeos cíclicos com cadeias laterais peptídicas cobertas com uma cauda alquil saturada hidrofóbica de ácido α,γ -diaminobutírico. Essas moléculas são policatiônicas (positivamente carregadas) e hidrofóbicas, capazes de deslocar os íons magnésio e cálcio dos grupos fosfatos, que são aniônicos (negativamente carregados). O deslocamento destes íons permite que as

moléculas antimicrobianas interajam eletrostaticamente com o lipídio A (negativamente carregado) do LPS da membrana externa. Essa perturbação leva a uma permeabilidade aumentada da membrana celular bacteriana, a um vazamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, a uma rápida morte celular (29, 45).

2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possui mecanismos de resistência naturais e adquiridos. Os naturais a tornam intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos, como ampicilina, cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações, ceftriaxona, ertapenem e sulfametoxazol/trimetoprim, enquanto os adquiridos podem torná-la resistente a antimicrobianos que normalmente teriam efeito. Os principais mecanismos em *P. aeruginosa* de resistência são alteração dos canais de porina, hiperexpressão de bombas de efluxo, degradação ou modificação do antimicrobiano, alteração estrutural na permeabilidade da membrana e alteração do sítio alvo (41).

2.4.1. PERDA OU ALTERAÇÃO DE PORINAS

Porinas são proteínas substratos específicas localizadas na membrana externa da célula bacteriana que permite a difusão de nutrientes e alguns antimicrobianos, como os carbapenêmicos (46). Grande parte da resistência intrínseca apresentada por *P. aeruginosa* a diversos antimicrobianos é devido à presença em grande proporção de porinas lentas, que permitem uma passagem em menor velocidade de solutos, inclusive antimicrobianos. A perda da porina OprD, ou quando expressa em níveis muito baixos, leva à resistência ao imipenem, pois este antimicrobiano usa primariamente esta porina específica para atravessar a membrana externa. Pode também haver uma mutação que torne a porina disfuncional. A deficiência da OprE está ligada à resistência a cefalosporinas, assim como a deficiência da proteína E2, que está também relacionada com resistência a fluorquinolonas (37, 46, 47).

2.4.2. BOMBAS DE EFLUXO

Bomba de efluxo é um mecanismo que pode exportar os antimicrobianos para o exterior da célula bacteriana. Em *P. aeruginosa*, existem cinco superfamílias de bombas de efluxo. A principal bomba é a MexB, da superfamília *resistance-nodulation-division* (RND), que é expressa constitutivamente, conferindo resistência natural a alguns antimicrobianos. As bombas de efluxo acabam por formar complexos entre si e com as porinas, sendo os principais: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprM e MexXY-OprM. A bomba de efluxo MexAB-OprM é bastante relevante em *P. aeruginosa*, pois está relacionada à resistência intrínseca e tem capacidade de exportar quase todos os beta-lactâmicos, inclusive meropenem e doripenem, mas não consegue exportar imipenem (48, 49). A bomba de efluxo MexCD-OprJ, cujo gene encontra-se em plasmídeos, pode exportar fluorquinolonas, beta-lactâmicos (preferencialmente cefalosporinas de 4ª geração), cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos. A bomba MexEF-OprN exporta fluorquinolonas, cloranfenicol e trimetoprim, mas não parece ter afinidade por beta-lactâmicos. Já a bomba MexXY, que parece estar relacionada à resistência intrínseca e pode associar-se a diversas porinas, como OprM, OpmB, OpmG, OpmH e Opml, exportando fluorquinolonas, cefepime, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (46).

Exceto por um estudo que relatou resistência a polimixina em *Yersinia* sp. por bomba de efluxo (50), esse mecanismo não parece estar relacionado à resistência a essa classe.

2.4.3. DEGRADAÇÃO OU MODIFICAÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO

Degradação de beta-lactâmicos realizada por hidrólise pela ação de enzimas beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência em Gram negativos. Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular, conforme Ambler, ou função, conforme Bush e Jacoby (51) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificações de beta-lactamases encontradas em *P. aeruginosa*.

Classificação de Bush e Jacoby	Classificação de Ambler	Tipos de enzimas
1	C	AmpC (PDC)
2b	A	TEM-1, -2, -90 (TLE-1) e -110 SHV-1
2be	A	PER-1, -2 VEB-1, -2 e -3 TEM-4, -21, -24, -42 e -116 SHV-2a, -5 e -12 GES-1, -2 e -5 BEL LBT 802 CTX-M-1, -2 e -43
2c	A	PSE-1 (CARB-2), -4 (CARB-1) CARB-3, -4, -like AER-1
2d	D	LCR-1 NPS-1 OXA-1-5, -7, -9-21, -24/40, -28, -30-32, -35, -45, -46, -50, -53 e, -161
2f	A	KPC-2 e -5
2b	B	IMP-1, -4, -6, -7, -9, -10, -12, -13, -15, -16, -18 e -22 VIM-1-5, -7, -8, -11, -13, -15-18 SPM-1 GIM-1 AIM-1

Fonte: adaptado de Zavascki et al. (2010).

Grande parte da resistência intrínseca apresentada por *P. aeruginosa* a diversos antimicrobianos é devido à produção cromossômica da enzima AmpC (37). Cepas selvagens que produzem AmpC em níveis basais são suscetíveis a penicilinas anti-pseudomonas, combinações de penicilina com inibidores, algumas cefalosporinas e carbapenêmicos. Contudo, quando os níveis de AmpC aumentam, *P. aeruginosa* pode se tornar resistente a todos os beta-lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos. O aumento no nível da produção de AmpC pode ser induzido por beta-lactâmicos, como cefoxitina e imipenem, ou inibidores de beta-lactamase, como clavulanato (46).

Em *P. aeruginosa*, dentro das carbapenemases, a classe com maior relevância clínica é a classe B, também denominada de metalo-beta-lactamase (MBL). As MBLs necessitam de um cofator íon metal, como o zinco, podendo então ser inibidas *in vitro* por agentes quelantes, como o EDTA e o ácido mercaptopropiônico. Estas enzimas degradam todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, e não têm sua atividade diminuída pelos inibidores de beta-lactamases clinicamente disponíveis, como o ácido clavulânico e

tazobactam (52). No Brasil, desde seu primeiro relato em 2002 (53), a MBL que se destaca atualmente em *P. aeruginosa* é a SPM-1, sendo a mais prevalente carbapenemase desta espécie em diversas regiões do país (54-62).

Enquanto algumas enzimas degradam o antimicrobiano, outras o modificam. Por exemplo, a resistência a aminoglicosídeos pode ocorrer pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Entre essas enzimas está a acetiltransferase aminoglicosídica, que catalisa a acetilação de grupo amino, diminuindo a atividade antimicrobiana. Outra enzima é a fosfotransferase aminoglicosídica, esta faz a fosforilação dos grupos hidroxil, o que introduz uma carga negativa na molécula antimicrobiana e muda a habilidade de se ligar ao sítio A no ribossomo. A última enzima é a nucleotidiltransferase aminoglicosídica, que catalisa a transferência de um grupo AMP do ATP para um grupo hidroxil na molécula de aminoglicosídeo. Esta última tem grande relevância clínica, pois confere resistência a tobramicina, gentamicina e amicacina (43).

2.4.4. ALTERAÇÃO ESTRUTURAL NA MEMBRANA CELULAR

Alteração no LPS pode levar à resistência a aminoglicosídeos. Uma redução da carga negativa na membrana diminui a interação eletrostática com a molécula antimicrobiana, interação necessária no primeiro estágio de ação desses fármacos. Além disso, uma mutação que provoque defeitos nos componentes da cadeia de transporte de elétrons, que está envolvido no transporte do fármaco para dentro da bactéria, também pode tornar a bactéria resistente (43).

Embora muito rara, resistência à classe das polimixinas pode ocorrer. O principal mecanismo envolve uma alteração na molécula LPS, por exemplo em *P. aeruginosa* pode ocorrer regulação positiva da proteína de membrana H1, que substitui o magnésio e o cálcio no LPS e, portanto, diminui a afinidade a polimixinas (1, 29). Além da substituição, pode haver uma menor quantidade desses cátions, diminuindo assim também a afinidade das polimixinas à membrana externa da bactéria (44).

2.4.5. ALTERAÇÃO DO SÍTIO ALVO

Outra forma de resistência a carbapenêmicos pode acontecer por mutação ou produção diminuída das PBPs (42). Quanto a aminoglicosídeos, pode ocorrer uma modificação do alvo, devido a mutações ou modificações enzimáticas. Um exemplo de modificação enzimática são as metiltransferases ribossomais, que transformam os nucleotídeos do sítio de ligação em derivados metil e levam, assim, à resistência a essa classe (43).

2.5. TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *P. aeruginosa*

A primeira escolha no tratamento contra *P. aeruginosa* envolve as cefalosporinas de 3ª ou 4ª geração, ceftazidima e cefepima, respectivamente, também chamadas de beta-lactâmicos anti-pseudomonas. Como segunda escolha, geralmente, são utilizados os carbapenêmicos entre os quais se destacam o meropenem, o imipenem e o doripenem, sendo que esse último apresenta baixa atividade contra cepas produtoras de MBL. Estes antimicrobianos são comumente utilizados de forma empírica quando há suspeita desta espécie ser a causadora da infecção, contudo eles possuem diferentes níveis de atividade (1, 37). Dentro da classe dos aminoglicosídeos que têm efeito sobre *P. aeruginosa* estão: gentamicina, ampicacina e tobramicina (1). Entretanto, esses antimicrobianos podem causar nefrotoxicidade e ototoxicidade, sendo assim uma das últimas linhas de tratamento, e são geralmente empregados em terapia combinada com outro fármaco anti-pseudomonas (29, 37). Como último recurso contra cepas multirresistentes, os oligopeptídeos, como polimixina B e colistina, voltaram a ser usados. Outros antimicrobianos que também podem ser utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* são as fluorquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina (1).

Devido à inexistência de novos antimicrobianos disponíveis no mercado, a terapia com antimicrobianos combinados começou a ser utilizada nos últimos anos. Essa forma de tratamento demanda mais custos e apresenta um risco maior de efeitos adversos, contudo pode potencialmente apresentar efeito sinérgico e reduzir

as chances de desenvolvimento de resistência (37). O uso de polimixinas e aminoglicosídeos, geralmente usados como último recurso em bactérias MDR, provoca nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade, o que preocupa e desencoraja sua utilização (12). Portanto outro propósito da terapia combinada é permitir a administração de doses menores dos antimicrobianos de forma a reduzir a toxicidade (63).

2.6. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Apesar de não haver uma padronização das técnicas para avaliar a atividade de antimicrobianos combinados, as principais são: a combinação de fitas de Etest®, CK, TK e HFIM.

Fitas de Etest® possuem um gradiente de concentração de um determinado antimicrobiano. Elas são colocadas em meio ágar Müller-Hinton após este ter sido inoculado com a bactéria de interesse numa escala 0,5 de MacFarland (técnica de disco-difusão). Após incubação por 18h a 24h, uma zona de inibição se forma ao redor da fita e a CIM é lida na intersecção da zona com a fita. Na técnica que utiliza essas fitas para avaliar sinergismo de antimicrobianos combinados, duas fitas são colocadas no ágar em forma de cruz, em um ângulo de 90°, na intersecção entre as CIMs, previamente determinadas, de cada antimicrobiano para o microrganismo avaliado (Figura 3). Outra forma de utilizar essas fitas para avaliação de sinergismo é colocar a fita do primeiro antimicrobiano sobre o ágar, já inoculado com a bactéria, após uma hora retirar esta fita e colocar a fita do segundo antimicrobiano na mesma posição (64).

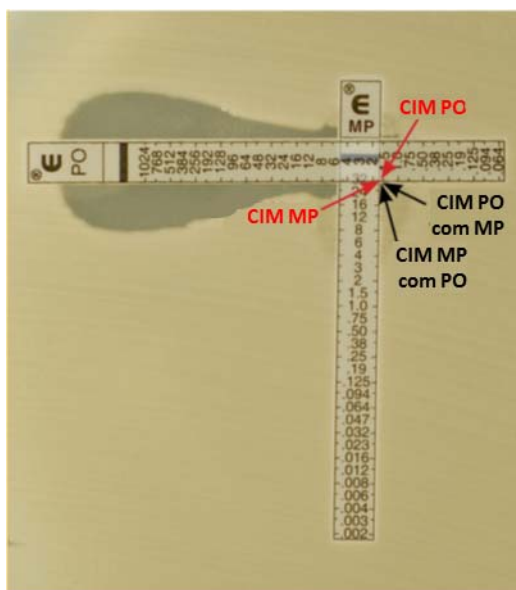


Figura 3. Técnica com fitas de Etest®. CIM PO: CIM de polimixina B. CIM MP: CIM de meropenem. Fonte: adaptado de Pankey et al. (2013) (65).

Após a determinação das CIMs dos antimicrobianos sozinhos e em combinações, calcula-se a concentração inibitória fracionada (FIC, do inglês *fractional inhibitory concentration*) para cada um dos antimicrobianos testados com as seguintes fórmulas:

- FIC da droga A = CIM da droga A em combinação / CIM da droga A sozinha
- FIC da droga B = CIM da droga B em combinação / CIM da droga B sozinha

Por fim, as FICs de cada antimicrobiano são aplicadas na fórmula para determinar o índice de concentração inibitória fracionada (FICI, do inglês *fractional inhibitory concentration index*):

- FICI = FIC da droga A + FIC da droga B

Nesta técnica, sinergia é definida como um FICI $\leq 0,5$, indiferença é definida como um FICI $> 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo ocorre quando FICI > 4 (64).

Já na técnica de CK, é realizada microdiluição em caldo em placas de 96 poços com diversas concentrações de antimicrobianos combinados. Após inoculação da bactéria nos poços com antimicrobianos, a placa é incubada por 18h a 24h. Existem quatro formas de interpretação das CIMs nesta técnica, a forma mais comumente utilizada está apresentada na figura 4. A partir das CIMs dos antimicrobianos isolados e combinados, são calculadas as FICs e o FICI da mesma forma como apresentada acima. As mesmas definições de sinergismo, indiferença e antagonismo são aplicadas (64, 66).

		Polimixina B ($\mu\text{g/mL}$)											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Imipenem ($\mu\text{g/mL}$)	2							CIM _B					
	4												
	8												
	16												
	32												
	64												
	128	CIM _A											
	256												

Figura 4. Exemplo de uma placa com antimicrobianos combinados.

CIM_A é concentração inibitória mínima de amicacina quando combinado. CIM_B é a concentração inibitória mínima de polimixina B quando combinado.

Na metodologia de TK, é realizada macrodiluição em caldo. Uma suspensão da bactéria, em fase *log* inicial, é inoculada com antimicrobianos combinados e isolados, em concentrações 0,5x, 1x e 2x a CIM. Nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas de incubação, alíquotas são retiradas, diluídas 1:10 em série e semeadas em meio de cultura sólido. Após incubação das placas, as unidades formadoras de colônia (UFC) são contadas e plotadas em um gráfico \log_{10} UFC/mL *versus* tempo, formando as curvas de tempo-morte. Nesta técnica, sinergismo é definido como uma redução $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL na combinação em comparação com o antimicrobiano mais ativo isoladamente e antagonismo como um aumento $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL na combinação em relação ao antimicrobiano mais ativo isoladamente (67, 68).

As técnicas até acima apresentadas são consideradas estáticas e não consideram a farmacocinética. De forma a tentar mimetizar *in vitro* a farmacocinética, foram desenvolvidos módulos com compartimentos e bombas de

infusão que permitem modelar a dosagem do antimicrobiano, bem como sua eliminação do sistema. No módulo com um compartimento, um reservatório contém o meio de cultura, a suspensão bacteriana e os antimicrobianos. Uma bomba de infusão adiciona meio ao reservatório enquanto outra bomba retira, porém células bacterianas também são eliminadas. Para contornar este problema, o HFIM foi desenvolvido. Nessa metodologia, um módulo consiste em um cartucho que contém milhares de fibras ocas que agem como filtros. O outro módulo é o reservatório que contém meio de cultura com antimicrobianos. A suspensão bacteriana fica no espaço fora das fibras, mas dentro do cartucho, enquanto o meio de cultura, juntamente com os antimicrobianos, circula do reservatório para o cartucho e do cartucho para o reservatório, entrando e saindo pelas fibras para entrar em contato com as bactérias. Uma bomba de infusão injeta meio e antimicrobianos no reservatório enquanto outra bomba retira esse meio do reservatório simulando a eliminação do antimicrobiano sem eliminar bactérias. Esse modelo permite dosar a concentração de UFC/mL bem como a concentração dos antimicrobianos em determinados tempos de exposição (20).

Alguns estudos compararam as técnicas avaliando a concordância entre elas, como por exemplo o realizado por Gülmez et al. (2010) (69) que encontraram concordância entre o método de Etest® e CK para a combinação de sulfametoxazol/trimetoprim com ceftazidima contra *Stenotrophomonas maltophilia*, contudo para a combinação de sulfametoxazol/trimetoprim com ticarcilina/clavulanato não houve tal efeito. Da mesma forma, Bonapace et al. (2000) (70), em *Acinetobacter baumannii*, encontrou concordância variável ao comparar a técnica de Etest® com TK (de 42 a 97%) e CK com TK (de 30 a 67%). Estudando *P. aeruginosa*, Cappelety et al. (1996) (71) demonstrou não haver concordância entre CK e TKC ao testar ceftazidima, cefepime, piperacilina ou piperacilina/tazobactam com amicacina, tendo a primeira técnica resultado em indiferença e a segunda em sinergismo.

A metodologia com fitas de Etest® é de fácil e simples execução, mas assim como o CK, apresenta índices relacionados à CIM, enquanto a técnica de TK pode fornecer a concentração bactericida. Além disso, também permite avaliar a atividade do antimicrobiano ao longo de todo o período do experimento. Um limitante dessas técnicas é o fato de não avaliarem a farmacocinética, situação que pode ser

abrandada com a aplicação do HFIM, contudo sua utilização é desestimulada devido ao alto custo. A técnica de TK, além de ser mais indicada em relação aos métodos com fitas de Etest® e CK, poderia ser usada como uma forma de selecionar cepas e combinações de antimicrobianos que, por exemplo, apresentaram sinergismo, a fim de confirmar esse resultado pelo HFIM, obtendo um resultado mais próximo aos modelos *in vivo* (20, 64).

2.7. ESTUDOS DE SINERGISMO EM *P. aeruginosa*

Desde a década de 1980, diversos estudos vêm avaliando a atividade de antimicrobianos combinados contra *P. aeruginosa*, com alguns apresentando sinergismo, indiferença ou atividade bactericida, mas não antagonismo, para as combinações de carbapenêmicos com aminoglicosídeos (14, 15, 72-79) e carbapenêmicos com polimixinas (15, 16, 78-84). Mais especificamente, há quatro estudos que combinaram imipenem com amicacina (72, 73, 76, 77), de duas ou três décadas atrás, e apenas um que tenha combinado imipenem com polimixina B (83) em isolados de *P. aeruginosa*.

Bustamante et al. (1987) (72) reportou sinergia, usando a metodologia CK, para a combinação de imipenem com amicacina em 47% dos isolados de *P. aeruginosa* sensíveis ao imipenem (CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$) e à amicacina (CIM 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$), enquanto para isolados resistentes ao imipenem (CIM > 8 $\mu\text{g/mL}$) e sensíveis ou resistentes à amicacina (CIM 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$), tal efeito foi incomum. A partir desse estudo poder-se-ia refletir sobre a ocorrência de sinergismo ter alguma relação com o nível da CIM. Contudo, Fujita et al. (1993) (75), usando a mesma técnica, encontrou sinergia em 90%, para a mesma combinação, em isolados resistentes a imipenem e amicacina, havendo também uma redução das CIMs até o ponto de corte de suscetibilidade. Este estudo reporta CIMs para imipenem de até ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ e para amicacina de 8 a > 128 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, Giamarellos-Bourboulis et al. (1996) (76), usando o ensaio de TK, demonstrou não haver significância estatística entre a combinação de carbapenêmicos com amicacina em relação ao nível da CIM. Ratificando este resultado, o mesmo grupo (Giamarellos-Bourboulis, 1997) (77) encontrou atividade bactericida aumentada em somente 38,5% dos isolados em 24h,

não significativa estatisticamente, com CIM de imipenem de 32 a >256 µg/mL e CIM de amicacina de 128 a >256 µg/mL. Quanto à combinação de imipenem com polimixina B, Landman et al. (2005) (83), com a técnica de CK, encontrou sinergia somente em 2 de 10 isolados de *P. aeruginosa* MDR (resistentes a imipenem).

Bergen et al. (2011) (16, 80) avaliaram, em cepas de *P. aeruginosa*, as combinações de imipenem com colistina e realizaram a detecção de metalo-beta-lactamases, contudo não relacionaram a presença de uma enzima desse tipo com a atividade de antimicrobianos combinados. No estudo realizado por Lim et al. (2011) (15), as enzimas IMP e VIM foram detectadas em diversos isolados, mas parecem não ter efeito sobre a atividade bactericida das combinações de meropenem com polimixina B e meropenem com amicacina, entre outras. Da mesma forma, os resultados do estudo feito por Pankuch et al. (2010) (79) também não demonstraram efeito de uma metalo-beta-lactamase em relação a combinações de doripenem com amicacina ou levofloxacina.

Devido à existência de poucos estudos recentes que avaliem combinações de imipenem com amicacina e imipenem com polimixina B em *P. aeruginosa*, torna-se relevante que mais pesquisas sejam realizadas. Além disso, nenhum estudo que avalie essas combinações detectou a presença de carbapenemases e, mais especificamente, não existem estudos até o momento que tenham realizado pesquisa de SPM-1 relacionando-a com a atividade de antimicrobianos combinados nessa espécie.

3. MARCO TEÓRICO

Em infecções por *P. aeruginosa* MDR, a polimixina B reemergiu como última opção terapêutica, contudo a resposta pode não ser satisfatória considerando a emergência de cepas resistentes. Assim, a avaliação da atividade antimicrobiana de fármacos combinados, pode auxiliar na escolha da melhor terapia combinada, o que leva a maiores chances de sucesso no tratamento.

4. JUSTIFICATIVA

Devido à diminuição no desenvolvimento de novos antimicrobianos (85) e a alta morbidade e mortalidade decorrentes de infecções por *P. aeruginosa*, além da alta toxicidade do uso de polimixina B (11, 31), novas opções terapêuticas são necessárias. Tendo isso em vista, a técnica TK apresenta-se como uma ferramenta para avaliar o sinergismo entre antimicrobianos como uma alternativa para tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR.

Uma vantagem ao se avaliar sinergismo por TK é verificar a possibilidade de atingir a atividade bactericida com concentrações menores ou subinibitórias dos antimicrobianos, visando diminuir a concentração necessária destes e, conseqüentemente, seus efeitos colaterais. Mesmo que discretamente, a CIM tende a diminuir quando um segundo antimicrobiano é acrescentado em concentrações subinibitórias (14).

Alguns estudos têm associado carbapenêmicos, polimixina B e aminoglicosídeos, contudo a maioria utilizou outros métodos que não fornecem informações suficientes para a avaliação das suas interações. Deste modo, estudos que utilizem métodos capazes de avaliar a interação dos fármacos ao longo do tempo são necessários, tendo em vista que são capazes de demonstrar com maior precisão as concentrações para se atingir a atividade bactericida e também os possíveis efeitos antagonistas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a atividade de amicacina e polimixina B isoladamente e combinados com imipenem contra diferentes clones de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmico.

5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Determinar a CIM para amicacina, polimixina B e imipenem nas amostras do estudo.
- Padronizar o método de TK para *P. aeruginosa*.
- Verificar o efeito sinérgico, antagônico e bactericida do imipenem em combinação com amicacina e polimixina B através da técnica TK contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*, selecionadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).
- Verificar a influência da presença do gene *bla*_{SPM-1} nas combinações estudadas.

6. REFERÊNCIAS

- 1-Morita Y, Tomida J and Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Antimicrob Resist Chem*. 2014; 4 (-) 422 1-8.
- 2-Atti MC, Bernaschi P, Carletti M, et al. An outbreak of extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care pediatric hospital in Italy. *BMC Infect Dis*. 2014; 14 (-) 494 1-8
- 3-Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010; 10 (4) 441-451.
- 4-Martis N, Leroy S, Blanc V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections A narrative review for the clinician. *J Infect*. 2014; 69 (-) 1-12.
- 5-Seyman D, Inan D, Ozen NS, et al. Un brote epidémico de endocarditis por *Pseudomonas aeruginosa* secundario a angiografía coronária. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (3) 261-267.
- 6-Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, et al. First Report of a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Coharboring KPC and VIM Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (10) 5422-5423.
- 7-Jácome PRLA, Alves LR, Cabral AB, et al. First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (9) 4990-4991.
- 8-Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (4) 1553-1555.
- 9-Cuzon G, Naas T, Villega MVs, et al. Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (11) 5350-5353.
- 10-Sekiguchi J-I, Asagi T, Tohru Miyoshi-Akiyama T, et al. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain That Caused an Outbreak in a Neurosurgery Ward

and Its *aac(6')*-*lae* Gene Cassette Encoding a Novel Aminoglycoside Acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49 (9) 3734-3742.

11-Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013; 8 (6) 1-20.

12- Mostardeiro MM, Pereira CAP, Marra AR, et al. Nephrotoxicity and Efficacy Assessment of Polymyxin Use in 92 Transplant Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57 (3) 1442-1446.

13-Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin. Pharmacother.* 2014; 15 (10) 1351-1370.

14-Lima DAFS, Nascimento MMP, Vitali LH, et al. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Revi Soc Bras Med Trop.* 2013; 46 (3) 299-303.

15-Lim T-P, Lee W, Tan T-Y, et al. Effective Antibiotics in Combination against Extreme Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *PLoS ONE.* 2011; 6 (12): e28177.

16-Bergen PJ, Tsuji BT, Bulitta JB, et al. Synergistic Killing of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula by Colistin Combined with Doripenem in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12) 5685-5695.

17-Lingscheid T, Tobudic S, Poepl W, et al. In vitro Activity of Doripenem plus Fosfomycin against Drug-Resistant Clinical Blood Isolates. *Pharm.* 2013; 91 (-) 214-218.

18-Lora-Tamayo J, Murillo O, J. Bergen PJ, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69 (-) 2434-2442.

19-Zusman O, Avni T, Leibovici L, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Synergy of Polymyxins and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chem.* 2013; 57 (10) 5104-5111.

20-Cadwell JJS. The Hollow Fiber Infection Model for Antimicrobial Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. *Adv Pharmacoeconom Drug Safety*. 2012; S1:007, 1-5.

21-Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

22-Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000; 406 (-) 959-964.

23-Nair AV, Joseph N, Krishna K, et al. A comparative study of coastal and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol*. 2015; 46 (3) 725-734.

24-Falkinham JO, Hilborn ED, Arduino MJ, et al. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Health Persp*. 2015; 123 (8) 750-758.

25-Rozej A, Cydzik-Kwiatkowska A, Kowalska B, et al. Structure and microbial diversity of biofilms on different pipe materials of a model drinking water distribution systems. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015; 31 (-) 37-47

26-Markussen T, Marvig RL, Gómez-Lozano M, et al. Environmental Heterogeneity Drives Within-Host Diversification and Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2014; 5 (5) 1-10.

27-Lee VT, Smith RS, Tümmler B, et al. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* Effectors Secreted by the Type III Secretion System In Vitro and during Infection. *Infect Immun*. 2005; 73 (3) 1695-1705.

28-Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol*. 2013; 21 (2) 73-81.

29-Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspec Med Chem*. 2014; 6 (-) 25-64.

30-Silva Filho LVRF, Ferreira FA, Reis FJC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J Bras Pneumol*. 2013; 39 (4) 495-512.

31-Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013; 67 (-) 159-173.

32-Winstanley C, O'Brien S, Brockhurs MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol*. 2016; 24 (5) 327-337.

33-Rojo-Bezaresa B, Estepa V, Cebolladac R, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol*. 2014; 304 (-) 405-414.

34-Turner KH, Everett J, Trivedi U, et al. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLOS Genetics*. 2014; 10 (7) 1-12.

35-Vongpaisarnsin K, Tansrisawad N, Hoonwiji U, et al. *Pseudomonas aeruginosa* septicemia causes death following liposuction with allogenic fat transfer and gluteal augmentation. *Int J Legal Med*. 2015;129 (4) 815-818.

36-Micol JB, Botton S, Guieze R, et al. An 18-case outbreak of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia in hematology patients. *Haematologica*. 2006; 91 (-) 1134-1138.

37-Kanj SS, Kanafani ZA. Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc*. 2011; 86 (3) 250-259.

38-Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (4) 1306-1311.

39-Osih RB, McGregor JC, Rich SE, et al. Impact of Empiric Antibiotic Therapy on Outcomes in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (3) 839-844.

40-Lodise Jr. TP, Patel N, Kwa A, et al. Predictors of 30-Day Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: Impact of Delayed

Appropriate Antibiotic Selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (10) 3510-3515.

41-Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, et al. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health.* 2014; 6 (-) 410-425.

42-Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (11) 4943-4960.

43-Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chem Biol.* 2013; 8 (-) 105-115.

44-Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections What are the Treatment Options?. *Drugs.* 2009; 69 (14) 1879-1901.

45-Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new?. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74 (3) 213-223.

46-Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22 (4) 582-610.

47-Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67 (4) 593-656.

48-Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (12) 3322-3327.

49-Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>.

50-Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiol.* 2000; 37 (1) 67-80.

51-Zavascki PA, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multi-drug resistance *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8 (1) 71-93.

52-Hong DJ, Bae K, Jang IH, et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47(2) 81-97.

53-Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemoth*. 2002; 50 (-) 673-679.

54-Cezário RC, Morais LD, Ferreira JC, et al. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27 (5) 269-274.

55-Doi Y, Ghilardi ACR, Adams J, et al. High Prevalence of Metallo- β -Lactamase and 16S rRNA Methylase Coproduction among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Ch*. 2007; 51 (9) 3388-3390.

56-Fernandes TA, Pereira CAP, Petrili AS, et al. Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e produtoras de metalo- β -lactamase isoladas em hemoculturas de crianças e adolescentes com cancer. *Rev Soc Brasil Med Trop*. 2010; 43 (4) 372-376.

57-Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clinics*. 2010; 65 (9) 825-829.

58-Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection*. 2007; 35 (-) 457-460.

59-Polotto M, Casella T, Oliveira MGL, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis*. 2012; 12 (176) 1-8.

60-Rizek C, Fu L, dos Santos LC, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13 (43) 1-5.

61-Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, et al. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25 (-) 57-61.

62-Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chem.* 2005; 56 (-) 1148-1151.

63-Mitsugui CS, Tognim MCB, Cardoso CL, et al. In vitro activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38 (-) 447-450.

64-Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda AK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6 (-) 71-79.

65-Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; *in press*.

66-Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44 (-) 363-366.

67-Moody, J. A. 1992. Synergy testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, p. 5.18.1–5.18.23. In H. D. Eisenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

68-CLSI. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline.* V 19 n° 18. Pensilvânia: CLSI, 1999.

69-Gülmez D, Çakar A, Sener B, et al. Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing. *J Infect Chemother.* 2010; 16 (-) 322-328.

70-Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, et al. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2000; 38 (-) 43-50.

71-Cappelletty DM, RYBAK MJ. Comparison of Methodologies for Synergism Testing of Drug Combinations against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40 (3) 677-683.

72-Bustamante CI, Drusano GL, Wharton RC, et al. Synergism of the Combinations of Imipenem plus Ciprofloxacin and Imipenem plus Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacterial Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31 (4) 632-634.

73-Dundar D, Otkun M. In-Vitro Efficacy of Synergistic Antibiotic Combinations in Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. *Yonsei Med J*. 2010; 51(1) 111-116.

74-Ferrara A, Grassi G, Grassi FA, et al. Bactericidal activity of meropenem and interactions with other antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1989; 24 Suppl. A, 239-250.

75-Fujita J, Negayama K, Takigawa K, et al. In-vitro activity of imipenem and amikacin combinations against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1993; 31 (-) 1007-1009.

76-Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Giamarellou H. In-vitro interactions of DX-8739, a new carbapenem, meropenem and imipenem with amikacin against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1996; 38 (-) 287-291.

77-Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Giamarellou H. Comparative In Vitro Interactions of Ceftazidime, Meropenem, and Imipenem with Amikacin on Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997; 29 (-) 81-86.

78-He W, Kaniga K, Lynch AS, et al. In vitro Etest synergy of doripenem with amikacin, colistin, and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with defined carbapenem resistance mechanisms as determined by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74 (-) 417-419.

79-Pankuch GA, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of doripenem with and without levofloxacin, amikacin, and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 67 (-) 191-197.

80-Bergen PJ, Forrest A, Bulitta JB, et al. Clinically Relevant Plasma Concentrations of Colistin in Combination with Imipenem Enhance Pharmacodynamic Activity against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula. *Antimicrob Agents Chem.* 2011; 55 (11) 5134-5142.

81-Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C, et al. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51 (-) 2005-2010.

82-Guelfi KC, Tognim MCB, Cardoso CL, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of meropenem in combination with polymyxin B and gatifloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother.* 2008; 20 (-) 180-185.

83-Landman D, Bratu S, Alam M, et al. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55 (-) 954-957.

84-Pankuch GA, Lin G, Seifert H, et al. Activity of Meropenem with and without Ciprofloxacin and Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (1) 333-336.

85-Nambiar S, Laessig K, Toerner J, et al. Antibacterial Drug Development: Challenges, Recent Developments, and Future Considerations. *Clin Pharmacol Therap.* 2014; 96 (2) 147-149.

7. ARTIGO

Artigo será submetido à revista *Journal of Medical Microbiology*.

***In vitro* antimicrobial activity of imipenem plus amikacin and imipenem plus polymyxin B against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates**

Camila M. Wilhelm^{1,2}, Andreza F. Martins^{1,3}, Afonso L. Barth^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: There are only a few options for treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* which leads to the use of “old” antimicrobials such as polymyxin B or combined therapy. Very few studies have assessed combined therapy, especially for imipenem plus amikacin and imipenem plus polymyxin B by time-kill assay against carbapenem resistant *P. aeruginosa*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of imipenem plus amikacin and imipenem plus polymyxin B. **Methods:** Twenty-seven carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were primarily selected for genome analysis and detection of *bla*_{SPM-1} gene. From the initial 27 isolates, 6 (3 SPM-1 positive and 3 SPM-1 negative) of different clones were chosen for time-kill assay. **Results:** For combinations of imipenem plus amikacin, synergy was observed in 3 isolates, of which two had relatively low minimum inhibitory concentrations (MIC) (imipenem 16

µg/mL and amikacin ≤32 µg/mL) for these antimicrobials, one was SPM-1 positive and two were negative. Antagonism occurred in 5 isolates for combinations of imipenem plus polymyxin B, independently of MIC levels or detection of *bla*_{SPM-1} gene. **Conclusions:** For imipenem plus amikacin combinations, synergism can occur when isolates present relatively low imipenem and amikacin MIC values. However, for imipenem plus polymyxin B combinations, antagonism was detected regardless the MIC values. Finally, we found no correlation between the presence or absence of *bla*_{SPM-1} gene with synergy/antagonism.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, imipenem, amikacin, polymyxin B, time-kill.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is one of the most frequent opportunistic pathogen which is able to cause infections especially in immunocompromised patients. This bacterium has been highly associated with bacteremia in severe burn individuals, with chronic lung infections in patients with cystic fibrosis and with acute ulcerative keratitis in contact lens users (Lyczak et al., 2000; Gellatly & Hancock, 2013).

The main resistant mechanisms in *P. aeruginosa* include efflux pumps overexpression, porine loss and production of enzymes that hydrolyze antimicrobials, such as carbapenemases (Bonomo & Szabo, 2006). In Brazil, the most relevant carbapenemase produced by *P. aeruginosa*, is the SPM-1 metallo-beta-lactamase (Sader et al., 2005; Gales et al., 2003; Martins et al., 2007; Zavascki et al., 2005). Some studies have reported that carbapenem-resistant *P. aeruginosa* is associated with considerable mortality risk (Suárez et al., 2010; Lautenbach et al., 2010; Kang et al., 2005; Peña et al., 2011; Dantas et al., 2014; Joo et al., 2011) which is higher when the isolate produces metallo-beta-lactamases (Zavascki et al., 2006).

As *P. aeruginosa* resistant to polymyxin B is uncommon, this drug is commonly used to treat infections due to MDR *P. aeruginosa*, even though some studies have reported nephrotoxicity and neurotoxicity due to polymyxins (Landman et al., 2008; Mostardeiro et al., 2013; Vattimo et al., 2016; Rigatto, 2016; Bahlis et al., 2015). Likewise, aminoglycosides are usually used as combined therapy for MDR *P.*

aeruginosa infections regardless the fact that these antibiotics may also cause ototoxicity and nephrotoxicity (Drusano et al., 2007; Rybak et al., 1999; Becker & Cooper, 2013). Therefore, polymyxin B and amikacin (AKN) are promising candidates for combined therapy, since a possible synergistic effect could be achieved with sub inhibitory concentrations (Zavascki et al., 2013).

Synergy studies assessing combination of carbapenem with polymyxin B or amikacin have reported contradictory results. Moreover, only a few studies have considered the presence of a metallo-beta-lactamase (but none SPM-1) as an independent factor which may influence the effectiveness of the combined therapy (Bergen et al., 2011a; Bergen et al., 2011b; Lim et al., 2011; Pankuch et al., 2008; Pankuch et al., 2010).

There are mainly three methods for assessing antimicrobial activity combinations: Etest®, checkerboard and time-kill curves. While the first and second techniques provide a fractional inhibitory concentration based on MIC, the latter can inform the bactericidal concentration and also demonstrate the antimicrobial activity over time (Balouiri et al., 2015).

Therefore, the aim of this study was to evaluate, by time-kill assay, the antimicrobial activity of imipenem plus amikacin and imipenem plus polymyxin B, against different carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains.

METHODS

Bacterial isolates

All carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates obtained from patients in Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were primarily selected, during the period from January to March 2015, resulting in 27 isolates. All isolates were identified, by conventional biochemical tests; glucose non-fermentative isolates which presented positive result in the oxidase test and production of pyoverdine/pyocyanin pigments were considered *P. aeruginosa*; isolates with ambiguous results were identified in the Vitek® automated system.

In order to select isolates for the time-kill assay, MIC to imipenem, amikacin and polymyxin B, detection of the *bla*_{SPM-1} gene and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) were performed. MIC was performed by broth microdilution test and interpreted according to CLSI (2016). The amplification of *bla*_{SPM-1} gene was made by conventional PCR using the following primers: 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' and 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'. The cycling parameters were 95°C for 5 minutes, 35 cycles of denaturation at 95°C for 20 seconds, annealing at 54°C for 45 seconds and extension at 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 10 minutes. The amplification product was loaded into 1.5% agarose gel with SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fischer®) which was submitted to electrophoresis and visualized under UV light. For genotype analysis, the isolates were submitted to DNA macrorestriction by *Xba*I, the fragments were loaded into 1.2% agarose gel and separated by PFGE with the following conditions: 5,9 V/cm, 5 seconds initial pulse, 30 seconds final pulse, total run time of 23 hours, CHEF DR II system. The gel was stained with etidium bromide, the fragments were visualized under UV light and the banding pattern was analyzed by BioNumerics 6.0. Isolates were considered from the same cluster when presented similarity equal or higher than 80%.

We selected isolates from different PFGE clusters, with low and high MICs for imipenem and amikacin, and with presence and absence of *bla*_{SPM-1} gene (Table 1). Isolates CWPA5, CWPA25 and CWPA26 were isolated from sputum and isolates CWPA8, CWPA16 and CWPA18, from urine. Only isolate CWPA25 was isolated from a cystic fibrosis patient.

Table 1. Characteristics of the isolates selected for time-kill assay and concentrations tested.

Isolates	PFGE type	MIC (µg/mL)			Antibiotic concentrations tested in TK assay (µg/mL)			<i>bla</i> _{SPM-1}
		IPM	AKN	PB	IPM	AKN	PB	
CWPA5	D	16 (R)	32 (I)	0.5 (S)	2	16	0.25, 0.5, 1	+
CWPA8	A	256 (R)	256 (R)	1 (S)	2	16	0.5, 1, 2	-
CWPA16	G	64 (R)	16 (S)	0.5 (S)	2	8, 16	0.25, 0.5, 1	+
CWPA18	C	>256 (R)	>512 (R)	1 (S)	2	16	0.25, 0.5, 1	+
CWPA25	E	16 (R)	32 (I)	0.25 (S)	2	16	0.125, 0.25, 0.5	-
CWPA26	G	128 (R)	8 (S)	0.25 (S)	2	4, 8, 16	0.25, 0.5, 1	-

MIC: minimal inhibitory concentration. IPM: imipenem. AKN: amikacin. PB: polymyxin B. S: susceptible. R: resistant. I: intermediate.

Time-kill assay

The time-kill assay was performed according to Moody (1992) and CLSI (1999). Colonies from a blood agar plate (grown overnight) were used to prepare an inoculum of approximately 3×10^8 CFU/mL in a cation adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB). This suspension was diluted 1:5 in CAMHB (6×10^7 CFU/mL) and an aliquot of this latter suspension was added to each tube containing antimicrobials (alone and in combinations) to achieve a final concentration of 6×10^5 CFU/mL. The tubes were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours. At times of 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h an aliquot was taken and serially diluted 1:10. From each dilution, 20 μL was plated in MacConkey agar plate which was incubated for 18 to 24 hours for CFU counting.

The concentrations of antibiotics for each isolate were defined according to the antibiotic MIC as well as to the doses used in clinical practice. We have tested 0.5x, 1x and 2x the MIC, in duplicates and the highest concentration used was the susceptibility breakpoint, according to CLSI (2016) (Table 2). All concentrations were tested alone (imipenem, amikacin and polymyxin B) and in combinations (imipenem plus amikacin, imipenem plus polymyxin B).

Synergism was defined as $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL decrease by the combination compared with the most active single agent and antagonism was defined as $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL increase by the combination compared with the most active single agent after 24 hours of incubation. Bactericidal activity was defined as $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL decrease by the antimicrobial alone or in combination compared to its respective initial inoculum (Moody, 1992; CLSI, 1999).

In order to correlate IPM MIC values with synergism/antagonism, we considered as relatively low, the MIC up to one fold greater than the MIC resistant breakpoint, according to CLSI (2016), and as relatively high, the MIC which were five or more fold higher than the MIC resistant breakpoint.

RESULTS

IPM resistant and AKN susceptible isolates (isolates CWPA16 and CWPA26)

The combination IPM plus AKN did not present synergism nor antagonism for isolate CWPA16, but for isolate CWPA26, synergism was found at 24h when the concentration was IPM plus AKN 2x MIC (Table 2). For this same isolate, when the concentration was IPM plus AKN 1x MIC, synergism occurred at 12h (supplementary material). For isolate CWPA16, no combination nor antibiotic tested alone presented bactericidal effect at 24h (Table 4), but for AKN 1x MIC alone and IPM plus AKN 1x MIC bactericidal effect occurred at 4h and 6h (supplementary material). Only combination of IPM with AKN 2x MIC demonstrated bactericidal effect at 24h for isolate CWPA26 (Table 4), however bactericidal effect also occurred at other moments for this combination, for IPM plus AKN 1x MIC combination and also for AKN 1x and 2x MIC alone (supplementary material). For isolate CWPA16, both combinations tested (0.5x and 1x MIC) presented regrowth at 6h and 4h, respectively. However, for isolate CWPA26, only combinations with 0.5x and 1x MIC demonstrated regrowth, it did not happen at 2x MIC combination (Figure 1).

IPM resistant and AKN intermediate isolates (isolates CWPA5 and CWPA25)

Synergism of the combination of IPM plus AKN 0.5x MIC was observed for the isolate CWPA5 in 24h (Table 2). This same concentration presented synergism for isolate CWPA25, but only at 12h (supplementary material). Combination of IPM and AKN 0.5x MIC presented bactericidal effect for isolate CWPA5 only before 24h and these antibiotics alone did not present bactericidal effect. In contrast, bactericidal activity was observed for both the combination of IPM and AKN and AKN alone for isolate CWPA25, but being IPM plus AKN 2x MIC the only concentration that presented this effect at 24h (Table 4). Isolates CWPA5 and CWPA25 demonstrated regrowth in the combination of IPM plus AKN at 6h and 12h, respectively (Figure 1).

IPM resistant and AKN resistant isolates (isolates CWPA8 and CWPA18)

IPM 2 µg/mL plus AKN 16 µg/mL, which correspond to the breakpoint MIC value for these antibiotics, presented no synergism nor antagonism for isolates CWPA8 and CWPA18 (Table 2). Moreover, no bactericidal effect was demonstrated for these isolates (Table 4) as both presented growth curves very similar to the control (Figure 1).

IPM resistant and PB susceptible isolates (all isolates)

Synergism at 0.5x MIC and 2x MIC PB combinations was observed for isolates CWPA5 and CWPA26, respectively. In contrast, antagonism was observed for isolates CWPA16 and CWPA26, both in IPM plus PB 1x MIC combination (Table 3). All concentrations of antibiotics, in combination or alone, presented bactericidal effect for all isolates at some point of the growth curves, except for isolates CWPA8 at concentration PB 0.5x MIC alone and isolate CWPA26 for concentrations PB 0.5x MIC alone and IPM plus PB 0.5x MIC (Table 5; supplementary material). Regrowth was observed for isolates CWPA8, CWPA16 and CWPA26 in combinations of IPM 2 µg/mL with PB 0.5x and 1x MIC. For isolate CWPA18, regrowth was noted only at PB 0.5x MIC (alone or in combination) and for isolate CWPA25 regrowth occurred for all concentrations (Figure 1).

Synergism/antagonism and SPM

When IPM with AKN combinations were tested, synergism was observed for one isolate SPM-1 negative and for one isolate SPM-1 positive (Table 2). In combinations with PB, antagonism was observed also for one isolate SPM-1 negative and for one isolate SPM-1 positive (Table 3). Combinations with AKN presented regrowth for 4 isolates (two SPM-1 positive and two SPM-1 negative). Regrowth was observed for all combinations of PB for all isolates regardless the presence of SPM-1 (Figure 1).

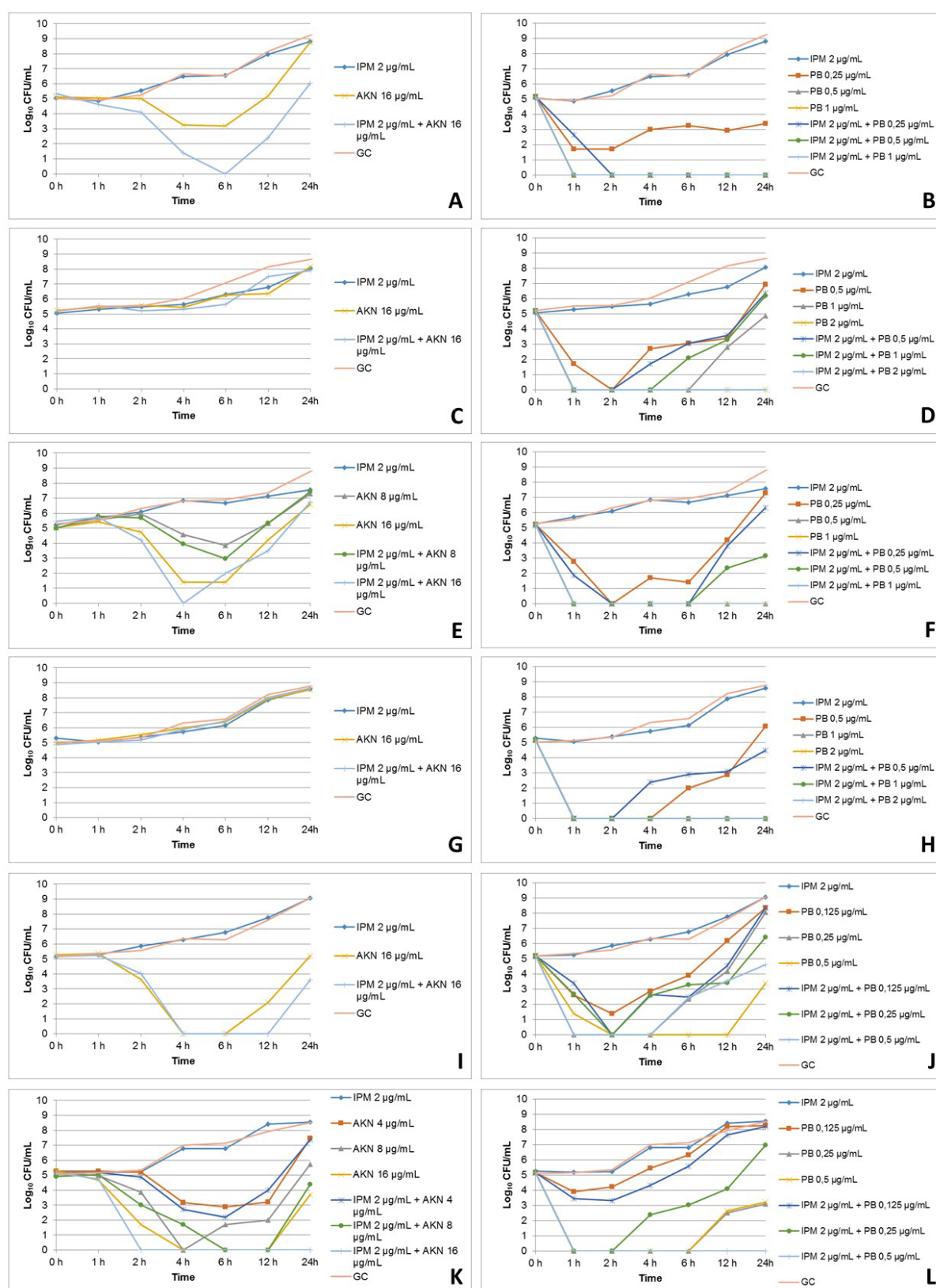


Figure 1. Time-kill curves of imipenem plus amikacin (left column) and imipenem plus polymyxin B (right column) for isolate CWPAs (A and B), isolate CWPAs (C and D), isolate CWPAs (E and F), isolate CWPAs (G and H), isolate CWPAs (I and J) and isolate CWPAs (K and L). GC: Growth control.

Table 2. Log₁₀ UFC/mL changes between AKN combinations and the most active single antibiotic after 24 hours exposure.

Isolates	MIC (µg/mL)		<i>bla</i> _{SPM-1}	Log ₁₀ UFC/mL changes			
	IPM	AKN		AKN 0.5x MIC	AKN 1x MIC	AKN 2x MIC	AKN 16 µg/mL
CWPA5	16	32	+	NT	NT	NT	-2.738 ^a
CWPA8	256	256	-	NT	NT	NT	-0.249
CWPA16	64	16	+	0.130	0.164	NT	NT
CWPA18	>256	>512	+	NT	NT	NT	0.109
CWPA25	16	32	-	NT	NT	NT	-1.597
CWPA26	128	8	-	-0.126	-1.312	-3.699 ^a	NT

IPM: imipenem. AKN: amikacin. NT: Not tested. ^a Sinergysm.

Table 3. Log₁₀ UFC/mL changes between PB combinations and the most active single antibiotic after 24 hours exposure.

Isolates	MIC (µg/mL)		<i>bla</i> _{SPM-1}	Log ₁₀ UFC/mL changes		
	IPM	PB		PB 0.5x MIC	PB 1x MIC	PB 2x MIC
Isolate CWPA5	16	0.5	+	-3.366 ^a	0.000	0.000
Isolate CWPA8	256	1	-	-0.597	1.320	0.000
Isolate CWPA16	64	0.5	+	-0.956	3.146 ^b	0.000
Isolate CWPA18	>256	1	+	-1.572	0.000	0.000
Isolate CWPA25	16	0.25	-	0.010	-1.636	1.215
Isolate CWPA26	128	0.25	-	-0.051	3.841 ^b	-3.224 ^a

IPM: imipenem. PB: polymyxin B. ^a Sinergysm. ^b Antagonism.

Table 4. Log₁₀ UFC/mL changes between AKN final inoculum and initial inoculum after 24 hours exposure.

Isolates	MIC (µg/mL)		<i>bla</i> _{SPM-1}	Log ₁₀ UFC/mL changes								
	IPM	AKN		IPM 2 µg/mL	AKN 0.5x MIC	AKN 1x MIC	AKN 2x MIC	AKN 16 µg/mL	AKN 0.5x MIC	AKN 1x MIC	AKN 2x MIC	AKN 16 µg/mL
Isolate CWPA5	16	32	+	3.761	3.654	NT	NT	NT	0.693	NT	NT	NT
Isolate CWPA8	256	256	-	2.999	NT	NT	NT	2.895	NT	NT	NT	2.706
Isolate CWPA16	64	16	+	2.329	2.250	1.523	NT	NT	2.431	1.261	NT	NT
Isolate CWPA18	>256	>512	+	3.273	NT	NT	NT	3.555	NT	NT	NT	3.778
Isolate CWPA25	16	32	-	3.875	-0.062	NT	NT	NT	-1.589	NT	NT	NT
Isolate CWPA26	128	8	-	3.270	2.207	0.526	-1.585	NT	2.242	-0.505	-5.161 ^a	NT

IPM: imipenem. AKN: amikacin. NT: Not tested. ^a Bactericidal effect.

Table 5. Log₁₀ UFC/mL changes between PB final inoculum and initial inoculum after 24 hours exposure.

Isolates	MIC (µg/mL)		<i>bla</i> _{SPM-1}	Log ₁₀ UFC/mL changes							
	IPM	PB		IPM 2 µg/mL	PB 0.5x MIC	PB 1x MIC	PB 2x MIC	PB 0.5x MIC	PB 1x MIC	PB 2x MIC	
Isolate CWPA5	16	0.5	+	3.761	-1.779	-5.100 ^a	-5.246 ^a	-5.198 ^a	-5.177 ^a	-5.146 ^a	
Isolate CWPA8	256	1	-	2.999	5.768	-0.280	-5.189 ^a	1.215	0.982	-5.171 ^a	
Isolate CWPA16	64	0.5	+	2.329	2.084	-5.211 ^a	-5.310 ^a	1.084	-2.075	-5.305 ^a	
Isolate CWPA18	>256	1	+	3.273	0.873	-5.154 ^a	-5.221 ^a	-0.721	-5.131 ^a	-5.084 ^a	
Isolate CWPA25	16	0.25	-	3.875	3.176	2.885	-1.773	3.163	1.254	-0.486	
Isolate CWPA26	128	0.25	-	3.270	3.066	-1.977	-1.910	3.017	1.813	-5.155 ^a	

IPM: imipenem. PB: polymyxin B. ^a Bactericidal effect.

DISCUSSION

Infections caused by MDR bacteria are worrisome due to the limited options for treatment. The restricted options of antimicrobials which may present toxicity, lead to the use of combined therapies (Zavascki et al., 2013). Regardless the fact that there are many studies demonstrating synergism against *P. aeruginosa*, (Ahmed et al., 2013; Bergen et al., 2011a; Bergen et al., 2011b; Cirioni et al., 2007; D'Souza et al., 2014; Dundar & Otkun, 2010; Lima et al., 2013; He et al., 2012; Mitsugui et al., 2011; Pankuch et al., 2008; Pankuch et al., 2010; El-Azizi, 2016), only a few evaluated imipenem in combination with amikacin (Giamerellos-Bourboulis et al., 1996; Giamerellos-Bourboulis et al., 1997) and none assessed imipenem plus polymyxin B by time-kill curves.

Synergism and antagonism

Isolates CWPA5 and CWPA25, which had relatively low MIC for AKN (32 µg/mL) and IPM (16 µg/mL), presented synergy, although IPM and AKN presented synergism for isolate CWPA25 only at 12h of incubation. Additionally, this combination did not present synergism for isolates CWPA8 and CWPA18 which presented higher MIC for these antimicrobials (IPM 256 µg/mL and AKN 256 µg/mL, IPM >256 µg/mL and AKN >512 µg/mL, respectively). Despite it was evaluated by a different methodology, Ferrara et al. (1989), using the checkerboard technique, demonstrated synergy of carbapenems combined with amikacin against *P. aeruginosa* when the imipenem MICs were relatively low (0.5 to 8 µg/mL). Similarly, Bustamante et al. (1987) found 47% of synergy when testing IPM plus AKN against *P. aeruginosa* with low IPM MIC (≤ 8 µg/mL) but this effect was uncommon for isolates with higher IPM MICs (> 8 µg/mL). Fujita et al. (1993) have found 90% of synergy of IPM with AKN against *P. aeruginosa* resistant isolates. These had IPM MIC ≤ 64 µg/mL, but variable AKN MICs (8 to > 128 µg/mL). However, Giamarellou-Bourboulis et al. (1996) have found different results. By time-kill assay, these authors demonstrated that there was no statistically difference between antimicrobial activity of carbapenems and amikacin regardless MIC levels of the isolates.

Results of different studies assessing combinations of carbapenems plus polymyxins seem to be more variable than carbapenem plus amikacin combinations. In our study, combinations of PB 0.5x MIC (0.25 µg/mL) and PB 2x MIC (0.5 µg/mL) for isolates CWPA5 and CWPA26, respectively, also presented well evidenced synergism. When testing IPM plus PB in IPM-resistant *P. aeruginosa*, by checkerboard method, Landman et al. (2005) have demonstrated synergy in only 2 out of 10 isolates. The authors did not specify the values of IPM MICs of isolates with positive results for synergism. In another study using two IPM-resistant *P. aeruginosa* isolates (IPM MIC 16 and 32 µg/mL), Bergen et al. (2011a) have found synergy of IPM plus colistin combinations (colistin 0.5x MIC plus IPM 8 µg/mL, colistin 4x MIC plus IPM 1 µg/mL and colistin 4x MIC plus IPM 8 µg/mL). It has to be considered that our study used lower concentrations of bacteria as well as lower antibiotic levels (up to 2x MIC).

Considering antagonism, we found combinations of IPM plus PB 1x MIC being antagonist for two isolates (CWPA16 and CWPA26). It has to be considered that the combination of PB 1x MIC plus IPM was also antagonist for isolates CWPA8 and CWPA25 but only before 24h of incubation. Cai et al. (2016) also found antagonism, for IPM plus PB combinations, but in carbapenem resistant *Escherichia coli*. One possible explanation for polymyxin B inhibition is a high concentration of calcium or magnesium, that can antagonize polymyxin binding to LPS (D'Amato et al., 1975; Davis et al., 1971), it would be necessary to evaluate whether the imipenem molecule also play a role as inhibitor of PB binding to LPS.

We found synergy and antagonism being a variable phenomenon among the isolates evaluated in our study as IPM plus PB presented synergism for one isolate (CWPA5); antagonism for four isolates (CWPA8, CWPA16, CWPA18 and CWPA25) and synergy plus antagonism for one isolate (CWPA26). Therefore, one could speculate that antagonism/synergism is not related to IPM MIC levels. In fact, there is a lack of *in vitro* studies applying time-kill curves to assess specifically IPM and PB combination for carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and, to date, there is also no study demonstrating *in vitro* antagonism for carbapenems and polymyxins combinations at sub- and inhibitory concentrations.

Bactericidal activity

We found bactericidal activity of IPM plus AKN combination for 4 of 6 isolates; the IPM MIC of the four isolates ranged from 16 to 128 µg/mL and AKN MIC from 8 to 32 µg/mL. The two isolates, to which the IPM and AKN were not bactericidal, presented relatively high MIC (IPM MIC ≥ 256 µg/mL and AKN MIC from 256 to ≥ 512 µg/mL). However, Lim et al. (2011), using time-kill assay, described bactericidal activity of meropenem plus AKN combination for 3 of 22 *P. aeruginosa* isolates and meropenem plus PB combination for 8 of 22 *P. aeruginosa*. Most of the combinations that showed bactericidal effect were effective against isolates with relatively high MIC values (IPM MIC ≥ 64 µg/mL, AKN MIC 64 to ≥ 128 µg/mL).

Regarding PB combinations, all combinations in our study presented bactericidal effect which may be due to the fact that the isolates were all susceptible to PB (MIC < 2 µg/mL). Moreover, PB (alone or in combination) tended to present a fast bactericidal activity as in 1h of incubation the effect was evidenced for all isolates. This is consistent with Cirioni et al. (2007) and Tam et al. (2005) findings, that demonstrated, in *P. aeruginosa*, colistin bactericidal action within 15 minutes and 2 hours, respectively, of exposure.

Presence of metallo-beta-lactamase

In our study, the presence or absence of the metallo-beta-lactamase SPM-1 did not present influence in the synergistic, antagonist or bactericidal effect. In line with this, Pankuch et al. (2008), Pankuch et al. (2010), Lim et al. (2011) and He et al. (2012), that used isolates with VIM and IMP enzymes in synergistic studies, have also found no correlation between these metallo-beta-lactamase and synergism, indifference or antagonism of combined antimicrobials.

Regrowth

In our study, most of the isolates presented regrowth along the period of the experiment, which appears to be a common feature in assays that assess antimicrobial activity in several times during the experiment (Bergen et al., 2011a; Bergen et al., 2011b; Bratu et al., 2005; Ferrara et al., 1989; Levison & Levison,

2009; Cappelletty & Rybak, 1996; Tam et al., 2005). The regrowth could be explained by the selection of resistant mutants, inactivation of the antimicrobial agent or regrowth of susceptible bacteria that have adhered to the wall of the tube (CLSI, 1999). New et al. (2013) have described antimicrobial chemical degradation in a hollow fiber infection model in 12h exposure. However, other studies (Tam et al., 2005; Bratu et al., 2005; Cai et al., 2016; Landman et al., 2005) have retested MIC of the survival population and found that their MICs increased compared to the initial population, suggesting that regrowth most likely occurs due to selection of resistant populations.

In conclusion, our study indicates that synergism of IPM and AKN was common for isolates of *P. aeruginosa* with relatively low IPM and AKN MIC values but when MIC values for these antimicrobials are relatively high, synergism usually does not occur. Moreover IPM and PB combinations may also present synergistic effect but at a variable rate; in fact the main effect of combination of IPM and PB against *P. aeruginosa* was antagonism which occur even with PB sub- and inhibitory concentrations. Additionally, the presence of *bla*_{SPM-1} gene does not seem to influence the antimicrobial activities assessed by time-kill assay. Finally, it would be important to establish a standard method using the same parameters (bacterial inoculum, antibiotic concentration etc) to evaluate combined antimicrobial activity in order to be possible to compare results inter laboratories.

Funding

This study was funded by FIPE/HCPA.

REFERENCES

Ahmed, Z., Khan, S. S. & Khan, M. (2013). In vitro trials of some antimicrobial combinations against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi J Biol Sci* **20**, 79-83.

Bahlis, L. F., Diogo, L. P., Lemons, D. & Klaus, D. (2015). Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B at a Tertiary Care Medical Center. *J Bras Nefrol* **37**(4), 446-450.

Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, A. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**, 71-79.

Becker, B. & Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chem. Biol* **8**, 105-115.

Bergen, P. J., Forrest, A., Bulitta, J. B., Tsuji, B. T., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Li, J. & Nation, R. L. (2011a). Clinically Relevant Plasma Concentrations of Colistin in Combination with Imipenem Enhance Pharmacodynamic Activity against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula. *Antimicrob Agents Chem* **55** (11), 5134-5142.

Bergen, P. J., Tsuji, B. T., Bulitta, J. B., Forrest, A., Jacob, J., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Nation, R. L. & Li, J. (2011b). Synergistic Killing of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula by Colistin Combined with Doripenem in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (12), 5685-5695.

Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **43**, 49-56.

Bratu, S., Quale, J., S. Cebular, S., Heddurshetti, R. & Landman, D. (2005). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**, 196-201.

Bustamante, C. I., Drusano, G. L., Wharton, R. C. & Wade, J. C. (1987). Synergism of the Combinations of Imipenem plus Ciprofloxacin and Imipenem plus Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacterial Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **31** (4), 632-634.

Cai, Y., Lim, T-P., Teo, J., Sasikala, S., Chan, E. C. Y., Hong, Y. J., Lee, W., Tan, T. Y., Tan, T. T. & other authors (2016). Evaluating polymyxin B-based combinations against carbapenem-resistant *Escherichia coli* in time-kill studies and in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother* In press, 1-27.

Cappelletty, D. M. & Rybak, M. J. (1996). Comparison of Methodologies for Synergism Testing of Drug Combinations against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40** (3), 677-683.

Cirioni, O., Ghiselli, R., Silvestri, C., Kamysz, W., Orlando, F., Mocchegiani, F., Matteo, F. D., Riva, A., Łukasiak, J. & other authors. (2007). Efficacy of tachyplestin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2005-2010.

CLSI (1999). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. V 19 n° 18. Pennsylvania: CLSI.

CLSI (2016). M-100 Document. <http://clsi.org/m100/>. Access: June 11, 2016.

D'Amato, R. F., Thornsberry, C., Baker, C. N. & Linda A. Kirven, L. A. (1976). Effect of Calcium and Magnesium Ions on the Susceptibility of *Pseudomonas* Species to Tetracycline, Gentamicin Polymyxin B, and Carbenicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **7** (5), 596-600

Dantas, R. C., Ferreira, M. L., Gontijo-Filho, P. P. & Ribas, R. M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol* **63**, 1679-1687.

Davis, S. D., Iannetta, A. & Wedgwood, R. J. (1971). Activity of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa*: Inhibition by Calcium. *J Infect Dis* **124** (6), 610-612.

Drusano, G. L., Ambrose, P. G., Bhavnani, S. M., Bertino, J. S., Nafziger, A. N. & Louie, A. (2007). Back to the Future: Using Aminoglycosides Again and How to Dose Them Optimally. *Clin Infect Dis* **45**, 753-60.

D'Souza, B. B., Padmaraj, S. R., Rekha, P. D., Tellis, R. C., Prabhu, S. & Pothen, P. (2014). In Vitro Synergistic Activity of Colistin and Ceftazidime or Ciprofloxacin Against Multidrug-Resistant Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* **20** (6), 1-5

Dundar, D. & Otkun, M. (2010). In-Vitro Efficacy of Synergistic Antibiotic Combinations in Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. *Yonsei Med J* **51** (1), 111-116.

El-Azizi, M. (2016). Novel Microdilution Method to Assess Double and Triple Antibiotic Combination Therapy *In Vitro*. *Int J Microbiol* **2016**, 1-10.

Ferrara, A., Grassi, G., Grassi, F. A., Piccioni, P. D. & Grassi, G. G. (1989). Bactericidal activity of meropenem and interactions with other antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **24** Suppl. A, 239-250.

Fujita, J., Negayama, K., Takigawa, K., Yamagishi, Y., Yamaji, Y., Kawanishi, K. & Takahara, J. (1993). In-vitro activity of imipenem and amikacin combinations against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **31**, 1007-1009.

Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S. & Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **52**, 699-702.

Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* **67**, 159-173.

Giamarellos-Bourboulis, E. J., Grecka, P. & Giamarellou, H. (1996). In-vitro interactions of DX-8739, a new carbapenem, meropenem and imipenem with amikacin against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **38**, 287-291.

Giamarellos-Bourboulis, E. J., Grecka, P. & Giamarellou, H. (1997). Comparative In Vitro Interactions of Ceftazidime, Meropenem, and Imipenem with Amikacin on Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **29**, 81-86.

He, W., Kaniga, K., Lynch, A. S., Flamm, R. K. & Davies, T. A. (2012). In vitro Etest synergy of doripenem with amikacin, colistin, and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with defined carbapenem resistance mechanisms as determined by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**, 417-419.

Kang, C-I., Kim, S-H., Kim, H-B., Park, S-W., Choe, Y-J., Oh, M-d., Kim, E-C. & Choe, K-W. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome. *Clin Infect Dis* **37**, 745-751.

Joo, E-J., Kang, C-I., Ha, Y. E., Kang, S-J., Park, S. Y., Chung, D. R., Peck, K. R., Lee, N. Y. & Song, J-H. (2011). Risk Factors for Mortality in Patients with

Pseudomonas aeruginosa Bacteremia: Clinical Impact of Antimicrobial Resistance on Outcome. *Microb Drug Resist* **17** (2), 305-312.

Landman, D., Bratu, S., Alam, M. & Quale, J. (2005). Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother* **55**, 954-957.

Lautenbach, E., Synnestvedt, M., Weiner, M. G., Bilker, W. B., Vo, L., Schein, J. & Kim, M. (2010). Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Emergence, Epidemiology, and Impact on Clinical and Economic Outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* **31** (1), 47-53.

Levison, M. E. & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am* **23** (4), 1-29.

Lim, T-P., Lee, W., Tan, T-Y., Sasikala, S., Teo, J., Hsu, L-Y., Tan T-T., Syahidah, N. & Kwa, A. L. (2011). Effective Antibiotics in Combination against Extreme Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *PLoS ONE* **6** (12), e28177.

Lima, D. A. F. S., Nascimento, M. M. P., Vitali, L. H. & Martinez, R. (2013). In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop* **46** (3), 299-303.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* **2**, 1051-1060.

Martins, A. F., Zavascki, A. P., Gaspareto, P. B. & Barth, A. L. (2007). Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection* **35**, 457-460.

Mitsugui, C. S., Tognim, M. C. B., Cardoso, C. L., Carrara-Marroni, F. E. & Garcia, L. B. (2011). In vitro activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 447-450.

Moody, J. A. (1992). Synergy testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In *Clinical microbiology procedures handbook*, p. 5.18.1–5.18.23. Edited by H. D. Eisenberg. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Mostardeiro, M. M., Pereira, C. A. P., Marra, A. R., Pestana, J. O. M. & Camargo, L. F. A. (2013). Nephrotoxicity and Efficacy Assessment of Polymyxin Use in 92 Transplant Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (3), 1442-1446.

New, L. S., Tze Peng Lim, T. P., Oh, J. W., Cheah, G. J. S., Kwa, A. L. & Chan, E. C. Y. (2013). Optimizing hollow-fiber-based pharmacokinetic assay via chemical stability study to account for inaccurate simulated drug clearance of rifampicin. *Anal Bioanal Chem* **405**, 1407-1415.

Pankuch, G. A., Lin, G., Seifert, H. & Appelbaum, P. C. (2008). Activity of Meropenem with and without Ciprofloxacin and Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **52** (1), 333-336.

Pankuch, G. A., Seifert, H. & Appelbaum, P. C. (2010). Activity of doripenem with and without levofloxacin, amikacin, and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diag Microbiol Infect Dis* **67**, 191-197.

Peña, C., Suarez, C., Gozalo, M., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E. & other authors (2012). Prospective Multicenter Study of the Impact of Carbapenem Resistance on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **56** (3), 1265-1272.

Rigatto, M. H., Oliveira, M. S., Perdigão-Neto, L. V., Levin, A. S., Carrilho, C. M., Tanita, M. T., Tuon, F. F., Cardoso, D. E., Lopes, N. T. & other authors (2016). Multicenter Prospective Cohort Study of Renal Failure in Patients Treated with Colistin versus Polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* **60** (4), 2443-2449.

Rybak, M. J., Abate, B. J., Kang, S. L., Ruffing, M. J., Lerner, S. A. & Drusano, G. L. (1999). Prospective Evaluation of the Effect of an Aminoglycoside Dosing Regimen on Rates of Observed Nephrotoxicity and Ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **43** (7), 1549-1555.

Sader, H. S., Castanheira, M., Mendes, R. E., Toleman, M., Walsh, T. R. & Jones, R. N. (2005). Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* **25**, 57-61.

Suárez, C., Peña, C., Gavaldà, L., Tubau, F., Adriana Manzur, A., Dominguez, M. A., Pujol, M., Gudiol, F. & Ariza, R. (2010). Influence of carbapenem resistance on

mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis* **14S**, e73-e78.

Tam, V. H., Schilling, A. N., Vo, G., Kabbara, S., Kwa, A. L., Wiederhold, N. P. & Lewis, R. E. (2005). Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49** (9), 3624-3630.

Vattimo, M. F. F., Watanabe, M., da Fonseca, C. D., Neiva, L. B. M., Pessoa, E. A. & Borges, F. T. (2016). Polymyxin B Nephrotoxicity: From Organ to Cell Damage. *PLoS ONE* **11** (8), e0161057.

Zavascki, A. P., Gaspareto, P. B., Martins, A. F., Gonçalves, A. L. & Barth, A. L. (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* **56**, 1148-1151.

Zavascki, A. P., Barth, A. L., Gonçalves, A. L. S., Moro, A. L. D., Fernandes, J. F., Martins, A. F., Ramos, F. & Goldani, L. Z. (2006). The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrob Chemother* **58**, 387-392.

Zavascki, A. P., Bulitta, J. B. & Landersdorfer, C. B (2013). Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* **11** (12), 1333-1353.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1. Log₁₀ UFC/mL changes between combination and the most active single antimicrobial.

Combination	Alone	Times						
		1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	
Isolate CWPA5								
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	AKN 16 µg/mL	-0.413	-0.886	-1.851	-3.176 ^a	-2.792 ^a	-2.738 ^a	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	-1.975	-1.699	-2.989 ^a	-3.243 ^a	-2.929 ^a	-3.366 ^a	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Isolate CWPA8								
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	AKN 16 µg/mL	0.106	-0.359	-0.137	-0.607	1.136	-0.249	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	-1.699	0.000	-1.000	-0.009	0.194	-0.597	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	0.000	0.000	0.000	2.097 ^b	0.472	1.320	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Isolate CWPA16								
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	AKN 0.5x MIC	0.231	-0.243	-0.623	-0.879	0.010	0.130	
IPM 2 µg/mL + AKN 1x MIC	AKN 1x MIC	0.305	-0.516	-1.398	0.602	-0.720	0.164	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	-0.903	0.000	-1.699	-1.398	-0.377	-0.956	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	2.352 ^b	3.146 ^b	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Isolate CWPA18								
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	AKN 16 µg/mL	-0.145	-0.368	-0.075	0.068	0.115	0.109	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	0.000	0.000	2.398 ^b	0.916	0.213	-1.572	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Isolate CWPA25								
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	AKN 16 µg/mL	-0.136	0.388	0.000	0.000	-2.097 ^a	-1.597	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	0.747	-1.398	-0.207	-1.439	-1.628	0.010	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	2.677 ^b	0.000	2.574 ^b	0.949	-0.761	-1.636	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	-1.398	0.000	0.000	2.439	3.541 ^a	1.215	
Isolate CWPA26								
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	AKN 0.5x MIC	-0.078	-0.310	-0.477	-0.699	0.785	-0.126	
IPM 2 µg/mL + AKN 1x MIC	AKN 1x MIC	0.062	-0.875	1.699	-1.699	-2.000 ^a	-1.312	
IPM 2 µg/mL + AKN 2x MIC	AKN 2x MIC	0.062	-1.699	0.000	0.000	0.000	-3.699 ^a	
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	PB 0.5x MIC	-0.450	-0.914	-1.129	-0.765	-0.533	-0.051	
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	PB 1x MIC	0.000	0.000	2.398 ^b	3.021 ^b	1.594	3.841 ^b	
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	PB 2x MIC	0.000	0.000	0.000	0.000	-2.653 ^a	-3.224 ^a	

IPM: imipenem. AKN: amikacin. PB: polymyxin B. ^a Sinergism. ^b Antagonism.

Table 2. Log₁₀ UFC/mL changes between times and its respective initial inoculum for amikacin.

Concentrations	Times					
	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Isolate CWPA5						
IPM 2 µg/mL	-0,190	0,489	1,429	1,511	2,890	3,761
AKN 0.5x MIC	-0,064	-0,105	-1,856	-1,929	0,084	3,654
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	-0,698	-1,213	-3,929 ^a	-5,327 ^a	-2,929	0,693
Isolate CWPA8						
IPM 2 µg/mL	0,240	0,420	0,575	1,240	1,713	2,999
AKN 16 µg/mL	0,204	0,333	0,200	1,012	1,109	2,895
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	0,370	0,034	0,123	0,465	2,304	2,706
Isolate CWPA16						
IPM 2 µg/mL	0,462	0,843	1,593	1,440	1,902	2,329
AKN 0.5x MIC	0,514	0,891	-0,485	-1,205	0,271	2,250
AKN 1x MIC	0,363	-0,310	-3,653 ^a	-3,653 ^a	-0,846	1,523
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	0,795	0,698	-1,057	-2,033	0,332	2,431
IPM 2 µg/mL + AKN 1x MIC	0,243	-1,252	-5,477 ^a	-3,477 ^a	-1,992	1,261
Isolate CWPA18						
IPM 2 µg/mL	-0,249	0,070	0,439	0,837	2,559	3,273
AKN 16 µg/mL	0,187	0,555	0,988	1,382	2,927	3,555
IPM 2 µg/mL + AKN 16 µg/mL	0,156	0,301	1,028	1,564	3,156	3,778
Isolate CWPA25						
IPM 2 µg/mL	0,079	0,684	1,108	1,602	2,583	3,875
AKN 0.5x MIC	0,117	-1,633	-5,267 ^a	-5,267 ^a	-3,170 ^a	-0,062
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	0,052	-1,175	-5,197 ^a	-5,197 ^a	-5,197 ^a	-1,589
Isolate CWPA26						
IPM 2 µg/mL	-0,083	-0,036	1,520	1,521	3,139	3,270
AKN 0.5x MIC	-0,004	-0,075	-2,089	-2,390	-2,061	2,207
AKN 1x MIC	-0,194	-1,307	-5,183 ^a	-3,484 ^a	-3,183 ^a	0,526
AKN 2x MIC	-0,607	-3,585 ^a	-5,284 ^a	-5,284 ^a	-5,284 ^a	-1,585
IPM 2 µg/mL + AKN 0.5x MIC	0,078	-0,224	-2,406	-2,928	-1,116	2,242
IPM 2 µg/mL + AKN 1x MIC	0,148	-1,903	-3,204 ^a	-4,903 ^a	-4,903 ^a	-0,505
IPM 2 µg/mL + AKN 2x MIC	-0,422	-5,161 ^a	-5,161 ^a	-5,161 ^a	-5,161 ^a	-5,161 ^a

IPM: imipenem. AKN: amikacin. PB: polymyxin B. ^a Bactericidal effect.

Table 3. Log₁₀ UFC/mL changes between times and its respective initial inoculum for polymyxin B.

Concentrations	Times					
	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Isolate CWPA5						
IPM 2 µg/mL	-0,190	0,489	1,429	1,511	2,890	3,761
PB 0.5x MIC	-3,447 ^a	-3,447 ^a	-2,157	-1,903	-2,216	-1,779
PB 1x MIC	-5,100 ^a	-5,100 ^a	-5,100 ^a	-5,100 ^a	-5,100 ^a	-5,100 ^a
PB 2x MIC	-5,246 ^a	-5,246 ^a	-5,246 ^a	-5,246 ^a	-5,246 ^a	-5,246 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-2,492	-5,198 ^a	-5,198 ^a	-5,198 ^a	-5,198 ^a	-5,198 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-5,177 ^a	-5,177 ^a	-5,177 ^a	-5,177 ^a	-5,177 ^a	-5,177 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,146 ^a	-5,146 ^a	-5,146 ^a	-5,146 ^a	-5,146 ^a	-5,146 ^a
Isolate CWPA8						
IPM BP	0,240	0,420	0,575	1,240	1,713	2,999
PB 0.5x MIC	0,522	-1,176	1,522	1,894	2,195	5,768
PB 1x MIC	-5,144 ^a	-5,144 ^a	-5,144 ^a	-5,144 ^a	-2,331	-0,280
PB 2x MIC	-5,189 ^a	-5,189 ^a	-5,189 ^a	-5,189 ^a	-5,189 ^a	-5,189 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-5,132 ^a	-5,132 ^a	-3,433 ^a	-2,071	-1,566	1,215
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-5,201 ^a	-5,201 ^a	-5,201 ^a	-3,104 ^a	-1,916	0,982
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a
Isolate CWPA16						
IPM 2 µg/mL	0,462	0,843	1,593	1,440	1,902	2,329
PB 0.5x MIC	-2,425	-5,204 ^a	-3,505 ^a	-3,806 ^a	-1,013	2,084
PB 1x MIC	-5,211 ^a	-5,211 ^a	-5,211 ^a	-5,211 ^a	-5,211 ^a	-5,211 ^a
PB 2x MIC	-5,310 ^a	-5,310 ^a	-5,310 ^a	-5,310 ^a	-5,310 ^a	-5,310 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-3,373 ^a	-5,249 ^a	-5,249 ^a	-5,249 ^a	-1,436	1,084
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-2,869	-2,075
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,305 ^a	-5,305 ^a	-5,305 ^a	-5,305 ^a	-5,305 ^a	-5,305 ^a
Isolate CWPA18						
IPM 2 µg/mL	-0,249	0,070	0,439	0,837	2,559	3,273
PB 0.5x MIC	-5,176 ^a	-5,176 ^a	-5,176 ^a	-5,176 ^a	-2,300	0,873
PB 1x MIC	-5,154 ^a	-5,154 ^a	-5,154 ^a	-5,154 ^a	-5,154 ^a	-5,154 ^a
PB 2x MIC	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a	-5,221 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-5,199 ^a	-5,199 ^a	-2,801	-2,282	-2,110	-0,721
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-5,131 ^a	-5,131 ^a	-5,131 ^a	-5,131 ^a	-5,131 ^a	-5,131 ^a
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,084 ^a	-5,084 ^a	-5,084 ^a	-5,084 ^a	-5,084 ^a	-5,084 ^a
Isolate CWPA25						
IPM 2 µg/mL	0,079	0,684	1,108	1,602	2,583	3,875
PB 0.5x MIC	-2,547	-3,778 ^a	-2,315	-1,259	1,014	3,176
PB 1x MIC	-5,166 ^a	-5,166 ^a	-5,166 ^a	-2,814	-0,982	2,885
PB 2x MIC	-3,773 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-5,171 ^a	-1,773
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-1,822	-5,198 ^a	-2,544	-2,720	-0,635	3,163
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-2,483	-5,160 ^a	-2,585	-1,858	-1,736	1,254
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,099 ^a	-5,099 ^a	-5,099 ^a	-2,659	-1,558	-0,486
Isolate CWPA26						
IPM 2 µg/mL	-0,083	-0,036	1,520	1,521	3,139	3,270
PB 0.5x MIC	-1,299	-0,957	0,262	1,138	2,987	3,066
PB 1x MIC	-5,083 ^a	-5,083 ^a	-5,083 ^a	-5,083 ^a	-2,571	-1,977
PB 2x MIC	-5,134 ^a	-5,134 ^a	-5,134 ^a	-5,134 ^a	-2,480	-1,91
IPM 2 µg/mL + PB 0.5x MIC	-1,747	-1,869	-0,864	0,375	2,456	3,017
IPM 2 µg/mL + PB 1x MIC	-5,133 ^a	-5,133 ^a	-2,735	-2,111	-1,027	1,813
IPM 2 µg/mL + PB 2x MIC	-5,155 ^a	-5,155 ^a	-5,155 ^a	-5,155 ^a	-5,155 ^a	-5,155 ^a

IPM: imipenem. AKN: amikacin. PB: polymyxin B. ^a Bactericidal effect.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as poucas opções disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR, novas alternativas são necessárias. A terapia combinada se tornou bastante promissora, contudo vem sendo empregada usualmente de forma empírica.

Considerando os resultados encontrados, foi possível avaliar a atividade das combinações de imipenem com amicacina e imipenem com polimixina B para diferentes isolados de *P. aeruginosa*. Para combinações de imipenem com amicacina parece haver uma tendência de ocorrer sinergismo quando as CIMs para esses antimicrobianos são menores, enquanto para CIM mais altas, esse efeito não ocorre. Já para combinações de imipenem com polimixina B, não parece haver a mesma tendência, com a ocorrência de sinergismo ou antagonismo sendo independentes dos valores das CIMs. Além disso, foi possível verificar que a presença do gene produtor da enzima SPM-1 não influencia na atividade antimicrobiana das combinações avaliadas.

A padronização da técnica de TK modificada para a contagem de colônias em gotas diminuiu o custo desta metodologia, sendo necessária uma menor quantidade de placas, contudo permanece sendo uma técnica bastante trabalhosa.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como este modelo de TK de avaliação de atividade antimicrobiana utilizado é estático, ele não considera a farmacocinética. Uma perspectiva futura seria estudar a possibilidade de adaptar esse modelo para incluir estas variáveis, por exemplo, aplicando o HFIM. Além disso, seria interessante aumentar o número da amostra para a qual foi realizada a técnica de TK, de forma a poder aplicar um teste estatístico para comprovar os achados.

ANEXOS

ANEXO I

	Item No	Recommendation	Please insert check where included or N/A where not applicable
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract – Pág 37	
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found – Pág 37-38	
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported – Pág 38-40	
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses – Pág 40	
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper – Pág 40	
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, treatment, follow-up, and data collection – Pág 40-42	
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up - NA <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls - NA <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants – Pág 40	

(b) *Cohort study*—For matched studies, give matching criteria and number of treated and untreated - **NA**

Case-control study—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case - **NA**

Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable – NA
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group – NA
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias – NA
Study size	10	Explain how the study size was arrived at – Pág 40
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why – Pág 40-42
Statistical methods	12	<p>(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding – NA</p> <p>(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions – NA</p> <p>(c) Explain how missing data were addressed – NA</p> <p>(d) <i>Cohort study</i>—If applicable, explain how loss to follow-up was addressed – NA</p> <p><i>Case-control study</i>—If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed – NA</p> <p><i>Cross-sectional study</i>—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy – NA</p> <p>(e) Describe any sensitivity analyses – NA</p>

Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed – NA
		(b) Give reasons for non-participation at each stage – NA
		(c) Consider use of a flow diagram – NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on other treatments and potential confounders – NA
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest – NA
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount) – NA
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included – NA
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized – NA
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period – NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses – NA
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives – Pág 42-48
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias – Pág

48-52		
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence – Pág 48-52
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results – Pág 52
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based – Pág 52
