

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Avaliação de sinergismo de polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de  
*Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos**

**Bárbara Helena Teixeira Netto**

**Dissertação de Mestrado**

**Fevereiro de 2013.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Avaliação de sinergismo de polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de  
*Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos

Bárbara Helena Teixeira Netto

Orientador: Dr. Alexandre Prehn Zavascki  
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,  
UFRGS, como requisito para obtenção do título  
de Mestre.

Dissertação de Mestrado

2013

## CIP - Catalogação na Publicação

Netto, Barbara Helena Teixeira

Avaliação de sinergismo de polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos / Barbara Helena Teixeira Netto. -- 2013.

68 f.

Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. terapia combinada. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. sinergismo. 4. polimixinas. 5. carbapenemases. I. Zavascki, Alexandre Prehn, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e por me dar força para superar sempre.

Agradeço ao meu Orientador Alexandre Zavascki, por ser um exemplo de pesquisador, agradeço pela oportunidade de crescimento profissional, pelo apoio e orientação.

A Faculdade de Medicina, pela oportunidade de realizar este curso de Pós Graduação.

As colegas de Pós- Graduação e em especial ao meu estagiário, Bruno Jamono, que desde o início esteve presente e se dedicou a este trabalho.

Aos amigos do Serviço de Esterilização do Serviço de Patologia Clínica, em especial a Dona Lúcia e ao Luiz Batista. A ajuda de vocês foi essencial.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Central do Hospital da Santa Casa (ISCOMPA), pelo apoio.

Ao meu irmão Rafael e minha cunhada Silvana, pelas palavras sempre de incentivo e de luta.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Ela é a fonte de toda verdadeira arte e ciência. "Albert Einstein

## RESUMO

*A.baumannii* é um importante patógeno em infecções nosocomiais principalmente por sua capacidade de se tornar resistente aos antimicrobianos. Surtos de *A.baumannii* resistente aos carbapenêmicos (ABRC) têm sido descritos em todo mundo. Devido à emergência de resistência aos antimicrobianos e ausência de novas opções de tratamento, as polimixinas reemergiram como opção de terapia contra infecções causadas por *A.baumannii*. O uso de polimixina é associado a maior mortalidade e menor eficácia comparada a outros antimicrobianos. Alguns estudos in vitro têm avaliado a combinação de polimixina com outros antimicrobianos a fim de aumentar a eficácia dos tratamentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o sinergismo entre a polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de ABRC, pelo método de Curvas Tempo-Morte bacteriana (Time- Kill Curves). Os isolados foram provenientes de banco de amostras e foram avaliadas as combinações de polimixina B com carbapenêmicos (imipenem e meropenem), tigeciclina, rifampicina, amicacina e ceftazidima. As combinações foram testadas nos tempo 0, 30', 1,4,12 e 24 h. Sinergismo entre polimixina B foi demonstrado contra todos antimicrobianos para ambos isolados, exceto para ceftazidima e imipenem no isolado 1. Nosso estudo mostrou que tigeciclina, amicacina e rifampicina são agentes mais ativos combinados com polimixina B, sendo assim estes agentes podem apresentar efeito benéfico em combinação com a polimixina no tratamento de ABRC.

Palavras-Chave: *A.baumannii* resistente aos carbapenêmicos, polimixina, terapia combinada, sinergismo.

## ABSTRACT

*A.baumannii* is an important pathogen in nosocomial infections primarily for its ability to become resistant to antimicrobials. Outbreaks carbapenem- resistant *A.baumannii* (CRAB) has been described worldwide. Due to the emergence of antimicrobial resistance and the absence of new treatment options, the polymyxins reemerged as an option therapy against infections caused by *A.baumannii*. The use of polymyxin is associated with higher mortality and lower effectiveness compared to other antimicrobials. In vitro studies have evaluated the combination of polymyxin with other antimicrobial agents to enhance the effectiveness of the treatments. This study was to evaluate the synergy between polymyxin B with other antimicrobials in isolates from ABRC, by Time-Kill Curves. The isolates were from stool samples and were evaluated combinations of polymyxin B with carbapenems (imipenem and meropenem), tigecycline, rifampin, amikacin and ceftazidime. The combinations were tested at time 0, 30', 1,4,12 and 24 h. Synergism between polymyxin B was demonstrated against all antimicrobials for both isolates, except for ceftazidime and imipenem in isolated 2. Our study showed that tigecycline, amikacin and rifampicin more active agents are combined with polymyxin B, and thus these agents may have a beneficial effect in combination with a polymyxin in treating CRAB.

Keywords: Carbapenem- resistant *A.baumannii*, polymyxin, combination therapy, synergism.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Potenciais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em <i>Acinetobacter</i> .....	21
Figura 2: Estrutura química da polimixina B.....	22
Tabela1: Principais estudos in vitro que avaliaram a terapia combinada com colistina ou polimixina em isolados de <i>A. baumannii</i> .....	26



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABRC: *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos

ABMR: *Acinetobacter baumannii* multiresistente

CIM: Concentração Inibitória Mínima

TKC: Time-Kill Curves

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1.1 Microbiologia do gênero <i>Acinetobacter</i> .....	12
2.1.2 Epidemiologia.....	14
2.1.3 Manifestações clínicas e tratamento de infecções por <i>A.baumannii</i> .....	18
2.1.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos e opções terapêuticas utilizadas em infecções por <i>A.baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos.....	19
2.2 Polimixina.....	22
2.3 Terapia combinada.....	24
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVO .....	30
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
6 ARTIGO .....	48
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	60
ANEXOS.....	61

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* spp compreende mais de 30 espécies diferentes, sendo que *A. baumannii* é a espécie de maior importância clínica (1). Esta espécie faz parte do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*, que incluem 4 espécies diferentes (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*). Estas espécies são extremamente semelhantes, em suas características bioquímicas de identificação, sendo distinguidas entre si apenas por métodos genotípicos (2).

*A.baumannii* é responsável por diferentes tipos de infecções (2), sendo considerado um importante patógeno causador de infecções nosocomiais. As infecções nosocomiais causadas por esta bactéria têm emergido de forma preocupante nos últimos anos, logo que é um patógeno de longa sobrevivência em ambiente hospitalar, causador de surtos institucionais e pela capacidade de adquirir múltiplos mecanismos de resistências aos antimicrobianos (3). Carbapenêmicos são os antimicrobianos de escolha para tratamento destas infecções, devido à resistência a outros  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. O aumento da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A.baumannii* (ABRC) se deve à presença mecanismos de resistência, como a perda de porinas e a presença de enzimas da classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) e classe D (OXA-carbapenemases) (4).

Com o surgimento de isolados de *A.baumannii* multiresistente (ABMR), as polimixinas têm sido utilizadas como opção terapêutica, devido à sensibilidade ao antibiótico. São antibióticos antigos, que foram abandonados devido à neurotoxicidade e nefrotoxicidade (5), porém reemergiram à prática clínica pela ausência de novos antibióticos e pelo aumento da prevalência da multiresistência em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *A.baumannii* entre outros bacilos gram-negativos multiresistentes (6; 7; 8).

O tratamento com polimixinas é associado com maior mortalidade quando comparado a outros antimicrobianos (9; 10) e o risco de mortalidade intra-hospitalar é quase duas vezes maior em pacientes tratados com esse antibiótico (11). Segundo Rigatto MH 2012 (12), o uso de polimixina no tratamento de pneumonia por ventilação mecânica e traqueobronquite causadas por *P.aeruginosa* e *A. baumannii* pode ser inferior a outros antimicrobianos.

A combinação de antimicrobianos tem sido estudada para tentar aumentar a eficácia dos tratamentos. A polimixina, combinada com outros antimicrobianos, pode aumentar a permeabilidade da membrana externa da parede celular bacteriana, permitindo a passagem da outra droga para o interior da célula, tendo assim o efeito antimicrobiano combinado (13; 14). Vários estudos *in vitro* avaliaram a combinação de polimixinas ou colistina com outros antimicrobianos em isolados de ABRC (14; 15; 16; 17; 18) apresentando efeito sinérgico ou não. Para avaliar o sinergismo entre antimicrobianos *in vitro*, existem três técnicas: O ensaio Curvas de Tempo- Morte bacteriana (Time-Kill Curves – TKC), método de E-test e Método de Checkerboard (17; 19).

Este estudo teve como objetivo avaliar o sinergismo entre a polimixina B com outros antimicrobianos contra dois isolados de ABRC, pelo método de Curvas Tempo-Morte bacteriana (Time-Kill Curves). A polimixina foi combinada com carbapenêmicos (imipenem e meropenem), tigeciclina, rifampicina, amicacina e ceftazidima.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1.1 Microbiologia do gênero *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* spp pertence à família *Moraxellaceae* e são classificados como: coco-bacilo Gram negativos não fermentadores de lactose, aeróbicos obrigatórios, imóveis, oxidase negativa, catalase positiva e não esporulados, com 39-47% moles de conteúdo GC em seu DNA (2; 20). Requerem exigências nutricionais mínimas e podem sobreviver em variadas superfícies e ambientes aquosos (21). Este organismo pode utilizar uma variedade de fontes de carbono e é capaz de crescer em ampla faixa de temperaturas e condições de pH (22). São de habitat natural no solo e na água, e podem ser isolados de alimentos, artrópodes, carne, peixes e do meio ambiente (21). A maioria das espécies isoladas de materiais clínicos cresce bem nos meios de cultura tradicionalmente utilizados na rotina laboratorial dos laboratórios de microbiologia na temperatura de 37°C (23).

Em 1911, o primeiro isolado foi descrito primeiramente como *Micrococcus calcoaceticus* pelo cientista alemão Beijerinck, por ser encontrado em solos ricos em calcário (acetato de cálcio) (24). Em 1954, o gênero bacteriano sofreu nova alteração taxonômica, ficando conhecido como *Acinetobacter* - do grego [akinetos] - não móvel (1; 25.) Em 1971, após sofrer inúmeras modificações taxonômicas, ficou estabelecida a sua nomenclatura até os dias de hoje. Entre as mais de 30 genomoespécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii* (genoespécie 2) é a espécie clinicamente mais importante e associada à doença humana (1; 26). *Acinetobacter pittii* e *nosocomialis*, anteriormente classificados como *Acinetobacter* sp 3 e 13TU, são outras espécies que são patogênicas ao homem, porém são encontradas com menor frequência (27; 28; 29). Estas três espécies juntamente com *Acinetobacter calcoaceticus* são muito similares geneticamente e fenotipicamente, não podendo ser diferenciadas entre si, por métodos convencionais de rotina, então o termo complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* foi proposto para se referir a esse agrupamento (2).

Dentre as espécies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* é a espécie nosocomial mais importante (27), mais prevalente e mais associada à resistência aos antimicrobianos e à mortalidade (30). *A.baumanii* é um patógeno humano oportunista que pode causar infecções

nosocomiais e frequentemente exibe perfil mais resistente devido à presença de mecanismos de resistência e sua capacidade de adquirir novos determinantes de resistência (20).

Estes microrganismos são conhecidos por sua capacidade de colonizar vários locais do corpo, como pele, feridas, trato gastrointestinal e respiratório de pacientes hospitalizados. Infecções por *A.baumannii* acometem principalmente pacientes com idade avançada, doenças subjacentes graves, imunossupressão, traumatismo, queimaduras, ou pacientes que realizaram algum procedimento invasivo, como a presença de cateteres, ventilação mecânica, antibioticoterapia e permanência hospitalar (20; 26), portanto pacientes críticos são os mais infectados em hospitais (31). São altamente resistentes a secagem e agentes de desinfecção, sobrevivendo grandes períodos no ambiente hospitalar. Podem permanecer na pele de pacientes por longos períodos, podendo provocar surtos de infecção hospitalar. Algumas espécies podem sobreviver por um longo período de tempo em superfícies inanimadas (32; 33), uma característica que promove a transmissão de contaminação hospitalar através de fomites (1; 34).

Os surtos de infecções causados por *Acinetobacter spp* podem ser controlados com medidas de controle reforçando a higienização das mãos, limpeza de pisos e paredes. Além disso, é imprescindível a esterilização de equipamentos médicos, leitos, roupas e equipamentos de ventilação (35).

### 2.1.2 Epidemiologia

Historicamente, *A.baumannii* é um patógeno de clima quente e úmido, onde tem sido a maior causa de infecções principalmente em unidades de tratamento intensivo causado por pneumonia comunitária (35; 37). É considerado um patógeno recorrente durante guerras e desastres naturais (2; 38). O *Acinetobacter* até as últimas três décadas era considerado um microrganismo de patogenicidade questionável, passou a ser considerado um importante agente causador de infecção hospitalar no mundo (38).

Desde as últimas duas décadas, tem sido comumente encontrado em regiões de clima temperado (2). Desde 1974, o Center for Disease and Control (CDC) tem notificado um aumento nas taxas de infecções nosocomiais (hospitalares) por *Acinetobacter* no verão em relação às outras estações do ano (39), podendo esse aumento chegar a 50% (39; 40). Possivelmente as explicações para essa variação podem estar relacionadas ao aquecimento e umidade do ar, que favorecem o crescimento do *Acinetobacter* e seu habitat natural, e a contaminação de ambientes potencialmente preveníveis, como filtros de ar- condicionado (38).

As infecções se caracterizam por pneumonia agressiva e elevada letalidade e estão ligadas ao alcoolismo e ao câncer (36; 37). A razão para maior prevalência de infecções por *Acinetobacter* em certas áreas geográficas não é bem conhecida, porém, pode estar relacionada a diferenças de temperatura e umidade, que influenciam bactérias colonizadoras (38).

Durante a Guerra do Vietnã, foram reportados 63 casos de soldados com infecção em tecidos moles. No período de 2002 a 2004, nas regiões do Afeganistão e Kwait, foram identificadas 85 infecções de corrente sanguínea entre os militares, sendo que em 4% dos casos já se mostravam com resistência (38; 41). Após o tsunami que atingiu o Sudeste Asiático em dezembro de 2004, foram relatados 17 casos de pessoas em estado grave que foram removidos para a Alemanha, foram isolados em 20% das amostras laboratoriais de ferida, sangue e material respiratório desses pacientes ABMR (38).

No ambiente hospitalar o *A.baumannii* está assumindo um papel importante, são inúmeros os relatos de surto de infecção hospitalar no mundo. O mais preocupante nesse

contexto é são a endemicidade nas instituições de saúde e a disseminação dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, o que reflete no aumento de mortalidade, morbidade e custos (2; 23; 41).

Segundo alguns estudos, até o início de 1970, infecções nosocomiais causadas por *A.baumanniii* eram tratadas com sucesso com um único agente ou em combinações de antibióticos. Entre 1971 e 1974 o aumento nas taxas de resistência começou a ser notado para aminoglicosídeos, cefalosporinas de primeira e segunda geração. Em 1975 foram reportados aumento de resistência para cloranfenicol e tetraciclina (20). Na década de 1990 foi descrita os primeiros casos de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A.baumanniii*, visto que, vários surtos vêm sendo descritos (23; 41). Segundo Gales et al 2006 (42), conforme os dados do Estudo SENTRY- Programa de Vigilância Antimicrobiana, no período de 2001 a 2004 as taxas de sensibilidade ao imipenem foram de 74% na Europa, Ásia e Pacífico, 86% na América Latina e 89% na América do Norte.

Na Europa os surtos por *A.baumanniii* são observados desde 1980, notavelmente na França, Alemanha, Inglaterra, Espanha, Itália e Holanda (23; 43). A principal fonte de transmissão é através de pacientes colonizados (23; 44). É difícil estabelecer a prevalência da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A.baumannii* em países europeus, visto que não é um agente patogênico monitorado pelo European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Alguns estudos citam taxas de resistência mais altas aos carbapenêmicos na Turquia, Grécia, Itália, Espanha, Inglaterra e teve um aumento na Europa Oriental. Porém são menores na Alemanha e Holanda (45; 46). A tipagem de isolados de *A.baumannii* revelou uma diversidade genotípica dentro da espécie, isso levou ao conhecimento de um número limitado de clones responsáveis pelos surtos hospitalares em muitos países (23; 31), sendo que a multiresistência é frequentemente associada a estes isolados que pertencem a estes clones denominados “clones internacionais” (47). Clones resistentes específicos são a causa predominante de surtos (48; 49). Foi descrito na Europa, três clones “pan” (classificados como I, II e III- também chamados de “clones europeus”) que tem se disseminado em áreas geográficas distintas (50) , assim novas epidemias clonais estão surgindo.

A maior parte dos surtos por *A.baumannii* pertencem a um único clone (51) , entretanto foram relatados surtos policlonais (43; 52), visto que cepas esporádicas coexistem frequentemente com as epidemias (43; 51). Surtos nosocomiais por *A.baumannii* envolvem



principalmente unidades de terapia intensiva, entretanto cepas epidêmicas podem ser encontradas em outras unidades do hospital (43; 53).

Nos Estados Unidos, conforme os dados no National Healthcare Safety Network (NHSN), no período de 2006 a 2008, 34% dos isolados de *A.baumannii* eram resistentes aos carbapenêmicos, juntamente com outras três classes de antimicrobianos (54). A resistência aos carbapenêmicos aumentou de 22% em 2002 para 52% em 2008 (55). Na África, os dados sobre a prevalência e resistência aos antimicrobianos em isolados de *A.baumannii* são limitados. Estudos na África do Sul citam resistência aos carbapenêmicos em 30% dos isolados de *A.baumannii* isolados de hemocultura. Estas cepas são endêmicas em unidades de queimados e terapia intensiva (23). Na Ásia e Oriente Médio foram documentados inúmeros surtos de ABMR e inúmeras carbapenemases foram originalmente descritas neste continente (23). Na Austrália e Oceania, as infecções comunitárias tem epidemiologia diferente da observada em infecções hospitalares, sendo que as cepas comunitárias são significativamente mais susceptíveis aos antimicrobianos (56). O primeiro surto na Austrália identificou que em 11% dos funcionários tinham *A.baumannii* presentes nas mãos, sendo que era a mesma cepa que estava causando a infecção nos pacientes (57).

Na America Latina, os índices de resistência aos carbapenêmicos segundo Programa MYSTIC, parecem ser as mais altas do mundo (58), além disso, vários genes de resistência têm sido identificados baseados em amostras isoladas no Brasil (59), Argentina (35) e Colômbia (60).

Poucos países latino-americanos possuem de programas de vigilância para monitoramento da resistência antimicrobiana, como Argentina, Chile e Colômbia (61; 62; 63). Brasil e México não tem um programa de controle nacional de resistência antimicrobiana, o que dificulta estimar a prevalência real da resistência aos antimicrobianos (64). Segundo dados do SENTRY, as infecções em corrente sanguínea e casos de pneumonia causadas por *Acinetobacter* spp correspondem respectivamente a 7,2% e 17,7, das infecções causadas por bacilos Gram-negativos na America Latina. (64). Entre os isolados da Argentina e de Centros Brasileiros, foi observado uma aumento na resistência ao imipenem e a carbapenemase mais frequente foi a *bla*<sub>OXA-23</sub>, enquanto a carbapenemase *bla*<sub>OXA-24</sub> foi isolada no México e na Argentina (64). No Brasil, as carbapenemases da classe D descritas são OXA-23 e OXA-143 (65; 66; 67). Recentemente foi descrita no Sul do Brasil a OXA-231, uma nova variante da OXA-143 (68).

No Brasil as taxas de resistência ao imipenem em isolados de *Acinetobacter* spp aumentaram de 12,6% no período de 1997-1999, para 71,4% em 2008-2010 (64). De acordo com o MYSTIC, *A.baumannii* foi o segundo patógeno mais prevalente isolado a partir de pacientes hospitalizados em UTIs (69). Os principais surtos que tem sido descritos no Brasil, são da região Sul e Sudeste (66; 69).

No Rio Grande do Sul, o primeiro caso de ABRC foi descrito em 2004, em um surto no qual envolveu 16 hospitais com mais de 500 isolados de 2004-2008, e que revelou, pela primeira vez a presença da enzima OXA-23 em Porto Alegre (70). Martins et al (71) avaliaram a incidência de ABRC, em um surto de infecção na cidade de Porto Alegre, em um período de 12 meses. Foram identificados oito grupos clonais por tipagem molecular, sendo que três destes estavam presentes em todos os hospitais, demonstrando assim, a disseminação dos clones em diferentes instituições hospitalares.

### 2.1.3 Manifestações clínicas e tratamento de infecções por *A.baumannii*

Os surtos causados por estes organismos aumentaram em todo mundo (72; 73), sendo assim as manifestações clínicas mais frequentes de infecções causadas por *Acinetobacter* spp, são particularmente associados à pneumonia por ventilação mecânica, bacteremia, pele, tecidos moles (74) e infecção do trato urinário, especialmente em unidades de tratamento intensivo (75; 76). Presença de cateter vascular tem sido associada frequentemente a bacteremia por *Acinetobacter* (77; 78).

O desenvolvimento de infecções adquiridas em unidades de tratamento intensivo está fortemente relacionado ao aumento no tempo de internação e associado com pior prognóstico como o aumento de morbidade e mortalidade (74; 79). Pacientes com hemocultura positiva para *A.baumannii* têm três vezes maior a taxa de mortalidade em UTI, exceto para infecções por *P.aeruginosa* e *Candida* spp. (23).

A resistência a múltiplas drogas tem sido relatada em taxas crescentes, sendo associada ao aumento da morbimortalidade (80). A mortalidade de infecções causadas por isolados de ABRC, em unidades de tratamento intensivo, são próximas a 50%, sendo maior em relação aos isolados bacterianos de *A.baumannii* susceptíveis aos carbapenêmicos (80).

As principais classes de agentes antimicrobianos considerados efetivos para o tratamento de *A.baumannii* são: sulbactam, cefalosporinas como cefepime e ceftazidima (antimicrobianos anti-pseudomonas), carbapenêmicos como imipenem e meropenem, monobactams, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina e polimixinas (3). Contudo a escolha da melhor terapia antimicrobiana é dependente das elevadas taxas de resistência de *A.baumannii* a maior parte destes antimicrobianos.

### 2.1.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos e opções terapêuticas utilizadas em infecções de *A.baumannii* resistente aos carbapenêmicos

A capacidade de adquirir resistência a quase todos os grupos de antibióticos disponíveis é um problema de grande preocupação mundial em isolados de *A.baumannii* (81).

Entre os mecanismos mais comuns de resistência antimicrobiana apresentada por cepas nosocomiais de *A. baumannii*, esta a produção de  $\beta$ -lactamases, bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana externa, alterações de canais da parede celular (porinas), mutação em alvos de antibióticos (quinolonas), produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos (3).

O aumento da utilização de carbapenêmicos no ambiente hospitalar nos últimos anos, como consequência de maior prevalência de infecções de bacilos gram-negativos resistentes às cefalosporinas de espectro ampliado, exerce maior pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, o que pode ocasionar aumento da resistência a estes agentes (4).

A emergência da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* se deve a mecanismos de resistência similares descritos em bactérias gram-negativas: produção de  $\beta$ -lactamases- que tem a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (carbapenemases); redução da permeabilidade da membrana externa, decorrente da perda ou expressão reduzida das porinas, o que resulta na diminuição da permeabilidade aos antimicrobianos através da membrana externa da célula bacteriana; a superexpressão bacteriana de bombas de efluxo pode diminuir a concentração de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos no interior da bactéria; e alterações da proteína ligadora de penicilinas (PBP), impedindo a sua ação (4; 41; 82). A resistência clínica em *Acinetobacter* geralmente são a associação de bombas de efluxo com super expressão de  $\beta$ -lactamase AmpC ou carbapenemases , conforme figura 1(38).

A presença de enzimas carbapenemases, da classe B (metaloenzimas) e D (enzimas OXA) são associadas à resistência aos carbapenêmicos (76). As enzimas OXA são da Classe D de Ambler e as mais importantes são OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58 e OXA-143 (4; 83).

Segundos estudos realizados em dois hospitais universitários de Porto Alegre (70) onde foram avaliados a resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii*, todos os

isolados testados foram positivos para a produção de carbapenemases OXA-23. Dados semelhantes também são descritos por Prates C et al (84), também realizados em Porto Alegre, no qual todos os isolados de ABRC, foram produtores de OXA-23 e positivos para blaOXA-51. A presença de carbapenemases, como por exemplo, a OXA-23, é um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* (76; 85; 86), sendo associado a surtos de ABRC, em todo mundo e no Brasil (66; 70).

Em infecções causadas por *A. baumannii*, as opções terapêuticas são mais restritas. Entre os agentes terapêuticos mais recomendados, estão as polimixinas – Polimixina B e Polimixina E (colistina), a tigeciclina e a ampicilina-sulbactam.

A tigeciclina é um novo antimicrobiano da classe das gliciliclinas, o mecanismo de ação desta droga é através da inibição da síntese proteica. O antimicrobiano se liga a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a incorporação de resíduos de aminoácidos no alongamento da cadeia peptídica (87). Tem a capacidade de evitar o principal mecanismo de resistência das tetraciclina, ligado a presença dos genes tet, promovendo a proteção ribossomal e bombas de efluxo (87). Tem atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas aeróbicas, anaeróbicas, microrganismos atípicos e micobactérias de crescimento rápido e ABMR (88; 89; 90). Alguns estudos têm sido citado resistência a tigeciclina em alguns surtos (89).

A ampicilina sulbactama é outra opção terapêutica possível no tratamento de infecções causadas por ABRC. Este antimicrobiano surgiu na década de 1980 como um inibidor de betalactamase. É uma molécula betalactâmica sintética que possui estrutura e propriedades farmacocinéticas e químicas semelhantes às aminopenicilinas. O mecanismo de ação da ampicilina-sulbatama é através da ligação irreversível as betalactamases, formando um complexo inativo que permite a ação do betalactamico (76; 91).

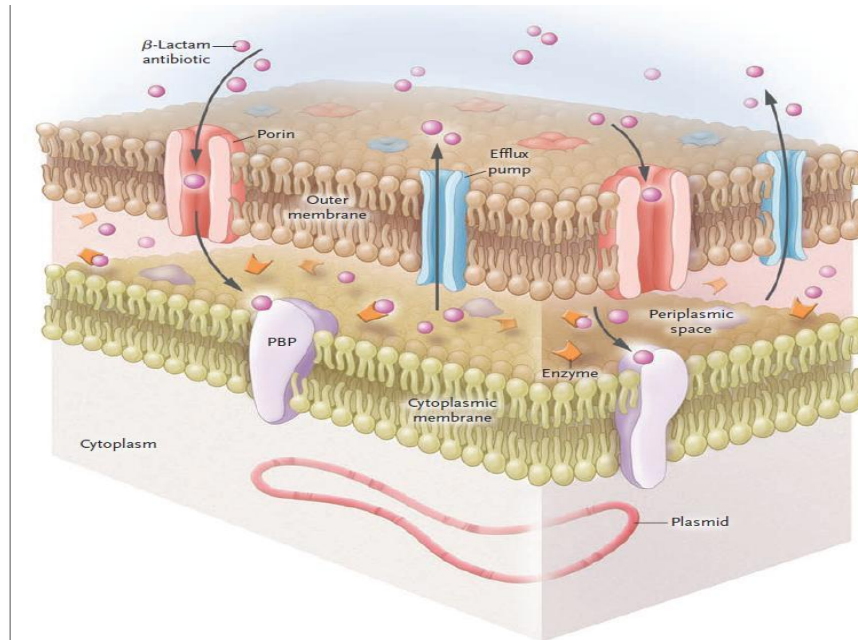


Figura 1: Potenciais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em Acinetobacter

Adaptado do artigo : Munoz-Price L. et al 2008 (38).

## 2.2 POLIMIXINAS

As polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos cíclicos naturalmente sintetizados pelo *Bacillus polymyxa* (polimixina) e *Bacillus colistinus* (colistina). Os antimicrobianos desta classe (colistina e polimixina B) atuam principalmente sobre a parede celular de bactérias gram-negativas, levando à rápida alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática e, finalmente, à morte celular. Tem ação bactericida rápida.

As polimixinas, que possuem carga positiva, ligam-se à membrana externa dos lipopolissacarídeos (LPS), deslocando  $Mg^{2+}$  e rompendo as pontes cruzadas entre  $Mg^{2+}$  e moléculas aniônicas da LPS na membrana externa, levando à desestabilização e ruptura das membranas externa e interna (92).

A estrutura química da polimixina B é demonstrada na figura 2.

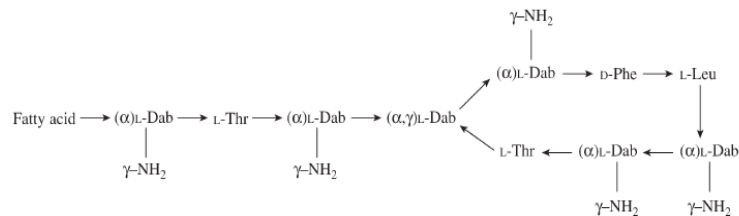


Figura 1: Estrutura química da polimixina B. Adaptado de Zavascki et al. , 2007 (6).

Das cinco polimixinas reconhecidas (A a E), apenas polimixinas B e E (colistina) são utilizadas comercialmente na terapêutica de infecções. As polimixinas foram abandonadas no final da década de 70, devido à sua nefrotoxicidade, neurotoxicidade (5) e pela descoberta de drogas melhor toleradas, permanecendo apenas para tratamento de infecções pulmonares causadas por *P.aeruginosa*, em pacientes com fibrose cística (93). Polimixina B e colistina têm demonstrado serem ativas contra *P. aeruginosa*.

Infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii*, tem emergido de forma preocupante, visto que é um patógeno com longa sobrevivência em ambiente hospitalar,

causando surtos institucionais e pela aquisição de múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (3). Com o surgimento de isolados de ABMR, exceto as polimixinas (94), essas drogas têm sido a única opção terapêutica possível. Dentre os bacilos gram-negativos, os isolados *A. baumannii*, são os mais resistentes a antimicrobianos e mais difíceis para controle e tratamento (91). Devido à ausência de novos antimicrobianos com atividade contra bacilos Gram-negativos, as polimixinas foram reintegradas como medicamentos de último recurso para tratamento de infecções graves causadas por cepas de bacilos gram-negativos multiresistentes (6; 7; 8 ; 95; 96).

Estudos citando testes de susceptibilidade antimicrobiana para *Acinetobacter* spp têm mostrado taxas de suscetibilidade elevada (95-99%) para polimixina B (98-100%) e para colistina (42; 97; 98; 99). Entretanto Arroyo et al 2005 (100) concluíram que apenas 80,9% dos isolados de *A. baumannii* foram sensíveis à colistina.

De acordo com alguns estudos realizados em Porto Alegre, para avaliar a eficácia clínica da polimixina, tanto em isolados de *P.aeruginosa* quanto de *A.baumannii*, foram demonstrado nestes estudos menor eficácia da polimixina B em comparação a outros antimicrobianos (11; 12), sendo que a terapia com polimixina pode ser inferior a outros antimicrobianos no tratamento de pneumonia por ventilação mecânica e traqueobronquite causadas por *P.aeruginosa* e *A. baumannii* (12).

Conforme Kvitko et al 2010 (11), o risco de mortalidade intra-hospitalar foi quase duas vezes maior para pacientes tratados com polimixina B. Outros estudos avaliaram a terapia de polimixina B ou colistina com ampicilina/sulbactam, colistina com meropenem e colistina com imipinem, no tratamento de infecções nosocomiais de ABRC. Foi descrito que o tratamento com polimixinas é associado com maior mortalidade quando comparado a outros antimicrobianos (9; 10).

O principal mecanismo de resistência associado à polimixina e colistina em isolados de *A.baumannii* e *P.aeruginosa*, são as alterações na permeabilidade celular (75). Entretanto essa resistência é rara. A heteroresistência tem sido reportada, embora muitas cepas multiresistentes apresentem alto índice de sensibilidade às polimixinas (101). Segundo um estudo realizado pelo SENTRY, onde foram avaliadas as taxas de susceptibilidade a colistina e polimixina em 40625 isolados de bacilos gram-negativos em todo mundo, a taxa de resistência encontrada foi entre <0,5% a 1,5% (101).



### 2.3 TERAPIA COMBINADA

A combinação de agentes antimicrobianos disponíveis tem sido investigada a fim de se aumentar a eficácia dos tratamentos. Combinada com outros antibióticos, as polimixinas podem atuar aumentando a permeabilidade da membrana externa da parede celular bacteriana e permitir a passagem da outra droga para o interior da célula, executando, assim, efeito antimicrobiano combinado (13;14).

Para avaliar o sinergismo entre antimicrobianos *in vitro*, não existe padronização, existem três testes que são utilizados. As opções para avaliar sinergismo são os ensaios de Time-Kill Curves – (TKC) ou Curvas Tempo-Morte bacteriana, Método de E-test (Pankey GA 2005) e Método de Checkerboard (17;19). O ensaio de TKC e o Método de Checkerboard são os métodos mais utilizados para avaliar sinergismo, embora sejam mais trabalhosos e demorados.

O Método de Checkerboard é um teste de microdiluição que avalia a CIM (Concentração Inibitória Mínima) de drogas sozinhas e combinadas. A partir do índice de fração inibitória, são realizados os cálculos para avaliar se houve sinergismo, antagonismo e indiferença (17; 19; 103).

O ensaio de TKC é realizado conforme as orientações do Clinical Laboratory Standards International (104), avalia o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos na tentativa de inibir o crescimento bacteriano de cepas de bactérias causadoras de infecções. Avalia a concentração do antimicrobiano e a morte da bactéria em diferentes intervalos de tempo do ensaio. O número médio de colônias (UFC/mL) obtidas com antimicrobiano combinado e sozinho é comparado com o controle sem antimicrobiano. Os resultados são expressos em log de UFC/mL. O sinergismo é definido como  $\geq 2\log_{10}$  na diminuição da contagem de colônias em 24 horas comparado a combinação do agente sozinho mais ativo (18; 103; 105).

Atividade bactericida é definida como uma redução de 99,9% ( $\geq 3\log_{10}$ ) da contagem total de UFC/mL no inóculo original. Atividade bacteriostática é definida como manutenção ou redução de 99,9% ( $\geq 3\log_{10}$ ) do número total de UFC/mL no inóculo original (104).

Alguns estudos in vitro, usaram a combinação de carbapenêmicos e polimixina, utilizando cepas de ABRC pelo método de TKC (16) pelo método de E-test (15) ou pelas duas metodologias TKC e checkerboard (17). Baseada na combinação de colistina e carbapenêmicos alguns estudos demonstraram atividade sinérgica in vitro por checkerboard (14;17) ou atividade indiferente por TKC (106) ou E-test (15). A combinação de carbapenêmicos com outros agentes antimicrobianos tem sido estudada com o objetivo de superar a resistência de ABRC (3). Em um estudo retrospectivo que avaliou a combinação de carbapenêmicos com ampicilina/sulbactam em isolados ABMR, associou a combinação com resultados superiores do que tratamento com carbapenêmicos associados à amicacina ou carbapenêmicos sozinho (107).

Em regimes de combinação de drogas com base na polimixina, o melhor estudado é a combinação com rifampicina, que tem mostrado atividade sinérgica in vitro contra ABMR tanto por TKC (18; 108) quanto por checkerboard (14; 17). Efeitos sinérgicos também foram descritos em estudos realizados com polimixina B associada à azitromicina e colistina associada à rifampicina contra *P.aeruginosa* (13; 109).

A combinação de colistina e minociclina foi avaliada através do método de TKC e por E-test e foi observado efeito sinérgico in vitro contra ABMR (110), enquanto a combinação com doxiciclina foi parcialmente sinérgica ou teve efeito aditivo confirmado por checkerboard (14). Por outro lado, a combinação de polimixina B e tigeciclina resultaram em atividade indiferente em ensaios de TKC (111), e a combinação de polimixina e ampicilina/sulbactam não teve efeito sinérgico in vitro provado tanto por TKC (106) quanto por checkerboard (112). Os principais estudos in vitro que avaliaram a combinação de colistina ou polimixina com outros antimicrobianos, em isolados de *A. baumannii*, estão na Tabela 1.

Tabela1: Principais estudos in vitro que avaliaram a terapia combinada com colistina ou polimixina em isolados de *A. baumannii*

Referencia do tipo de estudo	Desenho do estudo	Terapia combinada	Sinergismo ou maior eficácia com terapia combinada
Estudos in vitro			
Yoon et al (17)	2004 Checkerboard e estudos de TKC com oito cepas de ABMR	Polimixina B+ imipinem e/ou rifampicina	Sinergismo com duas ou três combinações
Song et al (18)	2007 Estudos de TKC com oito isolados de ABRC	Colistina + rifampicina	Sinergismo com combinações e com colistina sozinha
Tan et al (110)	2007 TKC e Método E-test	Colistina + Minociclina	Sinergismo com combinação mostrada apenas com análise TKC
Kroeger et al (113)	2007 TKC usando modelo farmacodinâmico in vitro	Colistina + infusão contínua de ceftazidima	Ceftazidima impedindo recrescimento e desenvolvimento de resistência a colistina
Tamurkaynak et al (14)	2006 Checkerboarder com cinco isolados de ABMR	Colistina + rifampicina; meropenem, azitromicina ou doxicilina.	Sinergismo com todos, exceto com doxicilina
Warehan et al (15)	2006 Combinação da fita Etest em cinco isolados <i>A.baumannii</i> produtor de OXA-23	Polimixina B+ imipinem, azitromicina ou rifampicina	Sinergismo marcante não visto
Giamarellos-Bourboulis et al (108)	2001 TKC com 39 isolados de ABMR	Colistina + rifampicina	Sinergismo observado, mais pronunciado com colistina 4x MIC

Manikal et al 2000 (114)	Checkerboard com 24 isolados de ABMR	Polimixina + meropenem, azitromicina, rifampicina ou sulfametoxazol-trimetropina	Sinergismo observado com meropenem e azitromicina
Tascini et al (112)	Checkerboard com cinco isolados	Polimixina B+ rifampicina ou ampicilina- sulbactam	Sinergismo observado somente com rifampicina
Hogg et al (115)	Checkerboard com 13 isolados de ABMR	Colistina+ rifampicina (11 isolados não eram susceptíveis a rifampicina)	Sinergismo observado em 11 isolados.
Tan et al (116)	TKC, checkerboard e fita E-test em 16 isolados de ABMR	Polimixina+ rifampicina, tigeciclina	Sinergismo com TKC em 40% dos isolados, 17% com checkerboard e 2% por método de E-test
Pankey et al (105)	TKC e E-test em oito isolados de <i>A.baumannii</i> resistentes ao meropenem	Polimixina B+ Meropenem	Sinergismo observado em todos isolados testados por TKC. Pelo método de E-test foi demonstrado sinergismo em 5 isolados e indiferença em 3 isolados
Tripodi et al 2007 (106)	TKC em nove isolados de ABMR produtores de OXA-58	Combinação de Colistina, imipinem, rifampicina e ampicilina-sulbactam	Sinergismo observado nas combinações: rifampicina + imipinem ou ampicilina/sulbactam em todos isolados. Sinergismo na combinação de colistina+ rifampicina, para isolados com MICs maiores para rifampicina.

- Lim et al 2011TKC em isolados de Combinações de polimixina, Efeito bactericida em 41,9% dos  
(117) ABRC rifampicina e tigecilina isolados na combinação de polimixina B + rifampicina, 29% na combinação de polimixina B+ tigecilina, enquanto na combinação de tigecilina+ rifampicina o efeito bactericida foi de 22,6%.
- Liang et alTKC em 14 isolados de Colistina+ Meropenem, Sinergismo in vitro encontrado em  
2011(118) ABMR Colistina+ rifampicina, todas as combinações contra os Colistina+ Minociclina e isolados de ABMR Minociclina + Meropenem
-

### 3. JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente disseminação de resistência aos carbapenêmicos mediadas por carbapenemases em *A. baumannii* causadores de infecções nosocomiais; que as drogas mais amplamente utilizadas para o tratamento dessas infecções são as polimixinas (polimixina B, no Brasil); que em estudos recentes essas drogas têm apresentado eficácia inferior a outros antimicrobianos; e que essas drogas continuarão a ser usadas por amplo período de tempo, pois não há perspectiva de novas drogas contra bacilos gram-negativos capazes de superar a resistência mediada por carbapenemases, um estudo que avalie a possibilidade de sinergismo desses antibióticos com outros antimicrobianos é de grande relevância na tentativa de otimizar o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos gerais

Avaliar o sinergismo pelos métodos Curvas de Tempo-Morte (Time-Kill Curves - TKC) bacteriana da polimixina B combinada com os antimicrobianos: carbapenêmicos (imipenem e meropenem) tigeciclina, meropenem, rifampicina, ampicacina e ceftazidima contra isolados de *A. baumannii* multirresistentes.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry MK, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASM Press, 2007:770-802.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 939–51.
3. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 751–62.
4. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 9:826-36.
5. Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:255-60.
6. Zavascki, A. P., L. Z. Goldani, J. Li, and R. L. Nation. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother*. 2007;60:1206–1215.
7. Falagas, M. E., and Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis*. 2005; 40:1333–1341.



8. Li J, Nation RL, Turnidge JD et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 589–601.
9. Paul M, Bishara J, Levcovich A et al. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1019–27.
10. Oliveira MS, Prado GV, Costa SF et al. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1369–75.
11. Kvitko CH, Kvitko1, Rigatto MH, Moro AL and Zavascki AP. Polymyxin B versus other antimicrobials for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; 66 :175-9.
12. Rigatto M. H, Ribeiro VB, Konze, D, Zavascki, AP. Comparison of polymyxin B with other antimicrobials in the treatment of ventilator-associated pneumonia and tracheobronchitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii*. *Infection* 2012.
13. Arnold TM, Forrest GN, Messmer KJ. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. *Am J Health Syst Pharm*. 2007; 64 :819-26.
14. Timurkaynak, F., Can F, Azap O. K., Demirbilek M, Arslan H, and Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006;27:224–8.
15. Wareham DW, Bean DC. In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of

*Acinetobacter baumannii* produci OXA-23 carbapenemases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5:10.

16. Pankuch GA, Lin G, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:333–6.

17. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:753-7.

18. Song JY, Kee SY, Hwang IS, et al. In vitro activities of carbapenem/ sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 317–22.

19. Mitsugui CS, Tognim MCB, Carrara-Marrone FE, Garcia LB Efeito antimicrobiano in vitro da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clinicas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Cienc Cuid Saude* 2008; 7(1): 76-81.

20. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148–65.

21. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42: 692–9.

22. Juni E. 1978. Genetics and physiology of *Acinetobacter*: *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 319-71.

23. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21: 538–582.
24. Beijerinck, MW. Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. *Cent Bakteriol Parasitenk* 1911; 29:169-176.
25. Euzeby JP. Dictionnaire de bacteriologie veterinaire. (Accessed February 19, 2008, at <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/acinetobacter.html>.)
26. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32 (2): 104–13.
27. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriol* 1993; 279: 544–52.
28. Houang ET, Chu YW, Leung CM, et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 228–34.
29. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, van der Reijden TKJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (Formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (Formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU)\**Research in Microbiology* 2011; 162:393-404.

30. Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC, et al. Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* Complex on Clinical Outcomes of Patients with *Acinetobacter* Bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 (3): 352-60.
31. Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., & Brisse, S. The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool, 2010;5 (4).
32. Ayats J, Corbella X, Ardanuy C et al. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *J Hosp Infect* 1997; 37: 287–95.
33. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, et al. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2881–7.
34. Getchell-White SI, Donowitz LG, Gröschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989; 10:402-7.
35. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, and Livermore D. Occurrence of OXA-58-Like Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 Years in Three Continents. *Antimicrob Agent Chemoth*, 2006, 756–758.
36. Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT. Severe community acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 2001; 120:1072-7.

37. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 2006; 129:102-9.
38. Munoz-Price L. Silvia, Robert A. Weinstein. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* 2008; 358:1271-81.
39. Smith PW. Seasonal incidence of *Acinetobacter* infection. *J Infect Dis* 1979; 140: 275-6.
40. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1133-7.
41. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51 (10):3471-84.
42. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54,731 clinical isolates of Gram negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:315–321.
43. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 284–95.
44. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3542–7.

45. Dobrewski, R., Savov E, Bernards AT, van den Barselaar M, Nordmann P, van den Broek PJ, et al. 2006. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. Clin. Microbiol. Infect. 12:1135–1137.
46. Wroblewska, M. M., Towner KT, Marchel H, and Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13:490–496.
47. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clin Microbiol 1996; 34: 1519–1525.
48. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in the Netherlands during the period 1999–2001. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 837–43.
49. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and southeast England. J Clin Microbiol 2006; 44: 3623–7.
50. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Res Microbiol 2004; 155: 105–12.
51. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 819–24.

52. Marques MB, Waites KB, Mangino JE, Hines BB, Moser SA. Genotypic investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect* 1997; 37: 125–35.
53. Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 981–83.
54. Kallen, A. J., et al. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2010; 31:528–531.
55. Mera, R. M., et al. *Acinetobacter baumannii* 2002–2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microb. Drug Resist.* 2010; 16:209–215.
56. Anstey, N. M., Currie BJ, and Withnall KM. Community-acquired *Acinetobacter pneumonia* in the Northern Territory of Australia. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14:83–91.
57. Riley, VT Webb, Cadwallader H, Briggs BD, Christiansen L, and Bowman RA. Outbreak of gentamicin-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit: clinical, epidemiological and microbiological features. *Pathology* 1996; 28:359–363.
58. Unal, Serhat, Garcia-Rodriguez, Jose Angel. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. *Diag Microb Infect Dis.* 2005; 53 (4):265-71.

59. Toleman M A, Simm MA, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemoth* 2002; 50, 673–679.
60. Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America—2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis* 2011;15: 34–9.
61. Briceno DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, Pacheco R, Montealegre MC, et al. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia. *Biomedica* 2010; 30: 371–81.
62. Garcia PC. Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infectol* 2003; 20(1):11–23.
63. Rossi A, Tokumoto M, Galas M, Soloaga R, Corso A. Monitoring antibiotic resistance in Argentina. The WHONET program, 1995–1996. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6: 234–41.
64. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010) *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2012; 73: 354–360.
65. Werneck JS, Picão RC, Girardello R et al. Low prevalence of blaOXA-143 in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4494–5.



66. Dalla-Costa LM, et al. Outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing the Risk factors for mortality in an ICU 7 OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 3403–3406.
67. Mostachioa AK, Levinb CAS, Rizeka C, Rossi F, Zerbinia J, Figueiredo C S. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012; 39: 396–401.
68. Gionco B, Pelayo JS, Venancio EV, Cayo R, Gales AC and Floristher E. Carrara-Marroni. Detection of OXA-231, a new variant of blaOXA-143, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2531–39.
69. Carvalho, Rangel K, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Galvão dos Santos LC, Pereira MJF, et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 34: 25–28.
70. Martins AF, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 2009; 37: 474–476.
71. Martins, A., Kuchenbecke RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL, the CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil American. *Journal of Infection Control* 2012; 40:108-12.
72. Basustaoglu AC, Kisa O, Sacilik SC et al. Epidemiological characterization of hospital acquired *A. baumannii* isolates from 1500 bed teaching hospital by phenotypic and genotypic methods. *J Hosp Infect* 2001; 47: 246–9.

73. Forster DH, Daschner FD. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:73–7.
74. Carey RB, Banerjee SN, Srinivasan A. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection, 1995-2004. Present at the 46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, September 27-30, 2006.
75. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. Critical Care 2006; 10 2:R48.
76. Zavascki, A. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 1: 71-93.
77. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin Infect Dis 1996; 22:1026-32.
78. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 2000; 31:690-7.
79. Fagon JY, et al. Mortality attributable to nosocomial infections in the ICU. Infect Contr Hosp Epidemiol 1994; 15: 428–434.

80. Sheng WH, Liao CH, Lauderdale TL, Ko WC, Chen YS, Liu JW, et al. A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14:764-9.
81. Bassetti, M., Repetto, E., Righi, E., Boni, S., Diverio, M., Molinari, M. P., Mussap, M., et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008; 61(2), 417–20.
82. Bonomo, RA and Dora Szabo. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006; 43 (2): 49-56.
83. Poirel L, Thierry N and Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D -Lactamases. *Antimicrob Agent Chemoth*. 2010; 54:24-38.
84. Prates CG, Martins AF, Superti SV, Lopes FS, Ramos F, Cantarelli VV, Zavascki AP. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiol. Infect*. 2010; 1-8.
85. Mugnier PD, et al. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16: 35–40.
86. Higgins PG, et al. Global spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65: 233–8.

87. Peterson LR. A review of tigecycline — the first glycylcycline. *International J Antimicrob Agent* 2008; 32: 215-222.
88. Rice LB. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43:(2):100-105.
89. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:128-31.
90. Munoz-Price LS, Baig MO, Lavin MA, et al. Clinical features and outcomes of Imipenem resistant (Imi-R) *Acinetobacter baumannii* (Ab) bloodstream infections (BSI). Presented at the 46th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, September 27–30, 2006.
91. Maragakis LL, Perl TM (2008) *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* 46: 1254–1263.
92. Clausell, A., Garcia-Subtracts, M., Pujol, M., Busquets, M.A., Rabanal, F., Cajal, Y., 2007. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J. Phys. Chem. B* 111, 551–563.
93. Falagas, M.E., et al., Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 2010; 4:132-8.
94. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y (2008) Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 52:813–821.

95. Li, J., Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, and Coulthard K. 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2005; 25:11–25.
96. Stein, A., and Raoult D. Colistin: an antibiotic for the 21st century? *Clin. Infect. Dis*. 2002; 35:901–902.
97. Diez AID, Perez MAB, Bouza JME, Gomez AA, Rodriguez PG, Gomez MAM, Domingo AO, Rodriguez-Torres A. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 487–493.
98. Dizbay M, Altuncekcic A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:29–32.
99. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:78–82.
100. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, Aznar J. Reliability of the E-Test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:903–905.
101. Gales AC, Jones RN and Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2070–2074.

102. Pankey GA, Ashcraft DS. In vitro synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2959–64.
103. White R, Burgess DS, Madhamavimanduru, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detection synergism: Time-kill, Checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*, Aug. 1996; 40:1914–18.
104. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A, vol. 19. NCCLS, Wayne, PA
105. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 537–401.
106. George A. Pankey, Deborah S. Ashcraft. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest® and time-kill assay. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 2009; 63:228–232.
107. Kuo LC, Lai CC, Liao CH, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 196–8.
108. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 117–20.

109. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:954-7.
110. Tan TY, Ng LS, Tan E, and Huang G. In vitro effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60:421–423.
111. Scheetz MH, Qi C, Warren JR, et al. In vitro activities of various antimicrobials alone and in combination with tigecycline against carbapenem-intermediate or -resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1621–26.
112. Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Del Favero A, Bistoni F. Evaluation of the activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 270–1.
113. Kroeger, L. A., Hovde LB, Mitropoulos IF, Schafer J, and Rotschafer JC. Colistin methanesulfonate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:3431-3.
114. Manikal, V. M., D. Landman, G. Saurina, E. Oydna, H. Lal, and J. Quale. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31:101–106.
115. Hogg, G. M., Barr JG, and Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41:494–495.

116. Tan T Y, Lim TP, Lee WHL, Sasikala S, Hsu LY, and Kwa ALH. In Vitro Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: the Effect of Testing by Time-Kill, Checkerboard, and Etest Methods. *Antimicrob A Chemoth* 2011; 55: 436–8.

117. Lim TZ, Tan TY, Winnie Lee, Sasikala S, Tan TT, Hsu LY et al. In-Vitro Activity of Polymyxin B, Rifampicin, Tigecycline Alone and in Combination against Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *PLoS ONE* 2011 6(4): e18485.

118. Liang, W, Liu XF, Huang J, De-mei Zhu, Li J and Zhang J . Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:109.



## **6. ARTIGO**

Artigo submetido à revista *International Journal Antimicrobial Agents*

Número do manuscrito: IJAA-D-13-00052

***In vitro* activity of non-bactericidal concentrations of polymyxin B in combination with other antimicrobials against OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii***

**Bárbara Netto<sup>a</sup>, Bruno J. Vieira<sup>b</sup>, Djuli M. Hermes<sup>a</sup>, Vanessa B. Ribeiro<sup>c</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>d,\*</sup>**

<sup>a</sup>Medical Sciences Post-Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup>Centro Universitário IPA Metodista, Porto Alegre, Brazil;

<sup>c</sup>Pharmaceutical Sciences Post-Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup>Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St., Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

\*Corresponding author: A. P. Zavascki. Present address: Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St., Porto Alegre 90.035-903, Brazil. Tel/Fax: +55 (51) 33598152  
E-mail address: azavascki@hcpa.ufrgs.br

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the combination of non-bactericidal concentrations of polymyxin B with other antimicrobials against two OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Time-kill studies with polymyxin B at 1x MIC for strain 01, and 1/4, 1/2 and 1x MIC for strain 02 were performed in combination with fixed concentrations of imipenem, meropenem, rifampicin, tigecycline, amikacin and ceftazidime. Synergism between polymyxin B at a concentration of 1x MIC and meropenem was observed in both strains, but only in strain 2 for imipenem. No synergism was detected between carbapenems and polymyxin B at subinhibitory concentrations in strain 2. Synergism between ceftazidime was only noted in strain 2 at a concentration of 1x MIC of polymyxin B. Tigecycline, amikacin and rifampicin presented synergism in combination with polymyxin B in both strains and at all concentrations of polymyxin B in strain 2. These three drugs were the most active agents in combination with polymyxin B, as demonstrated by a strong bactericidal effect even at subinhibitory concentration of polymyxin B.

Keywords: polymyxin B; combination therapy; carbapenemases, synergism; colistin;

*Acinetobacter baumannii*

## 1 Introduction

*Acinetobacter baumannii* is a major nosocomial pathogen and these organisms are usually difficult to treat due to multidrug resistance profile commonly found in many isolates [1]. Resistance to carbapenems is of particular concern since they have been of the mainstream agents against these organisms [1]. However, carbapenem resistance has become widely disseminated owing to the emergence of Class D carbapenemases-producing isolates [2].

Polymyxins, both B and E, are often the last therapeutic option against carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) isolates [1, 3]. The combination of polymyxins with another antimicrobial agent has been proposed, and has been increasingly used, in order to overcome some shortcomings of polymyxins in monotherapy, including the potential for the emergence of hetero-resistant subpopulations and a possible limited bactericidal activity *in vivo*, considering recent pharmacokinetics studies of the drugs [3]. Additionally, some studies have demonstrated worse clinical outcomes of polymyxins when compared with other antimicrobials and combination therapy has been shown to be superior in some observational studies with patients infected by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [1, 4]. *In vitro* studies may provide some support in assessing which other antimicrobial would more likely present a beneficial effect when combined with polymyxins against distinct organisms.

In this study, we aimed to evaluate the combination of non-bactericidal concentrations of polymyxin B, which are also more likely to be clinically achieved according to recent pharmacokinetic studies [3], with other antimicrobials in concentrations usually reached with common dosage regimes against OXA-23-producing *A. baumannii* isolates.

## 2 Methods

### 2.1 Clinical isolates

Two distinct carbapenem-resistant strains recovered from patients admitted at Porto Alegre hospitals between 2007-2008 were selected for the study [5]. Both were positive for *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-23</sub> genes and were characterized as distinct strains as reported elsewhere [5].

MICs for polymyxin B, meropenem, imipenem, tigecycline; rifampicin, amikacin and ceftazidime were determined by broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [6].

### 2.2 Time-kill studies (TKS)

TKS with polymyxin B at 1x MIC for strain 01, and 1/4, 1/2 and 1x MIC for strain 02 were performed in combination with fixed concentrations of imipenem (4 mg/L), meropenem (4 mg/L), rifampicin (1 mg/L), tigecycline (1 mg/L), amikacin (16 mg/L) and ceftazidime (8 mg/L). All experiments were performed in duplicated.

Sterile tubes were filled with freshly cation-adjusted Muller- Hinton broth - CAMHB prepared to a volume of 10 mL with no antibiotic (growth control) and antibiotic concentrations described above, alone and in combination. Four to six colonies were selected and suspended in 5 mL of CAMHB. The colonies were allowed to grow to a log phase and the final inoculum of approximately  $5 \times 10^5$  colony-forming units (CFU)/mL containing the drugs was incubated in a shaking water bath at 35°C in ambient air [7]. Samples were removed from each bottle at 0, 30 min, 1, 4, 12 and 24 hours Serial 10-fold dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) were performed in 0.9 % sterile sodium chloride solution. Aliquots of 10 $\mu$ L were plated on agar plate with 5% sheep blood. Plating was performed in duplicate and the plates were

incubated for 24 hours at 35°C. Colonies counts were averaged between the duplicate plates for each experiment. A grow control was included with each isolated tested. Quality control was performed using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### 2.3 Definitions

Synergy was defined as a  $\geq 2 \log_{10}$  decrease in colony count after 24 h by the combination compared with the most active single agent. Indifference was defined as a  $< 2 \log_{10}$  increase or decrease in colony count at 24 h by the combination compared with that by the most active drug alone. Antagonism was defined as a  $\geq 2 \log_{10}$  increase in colony count after 24 h by the combination compared with the most active drug alone [7].

## 3 Results

The MICs of the strains 01 and 02, respectively, for the following drugs were 0.25 and 2 mg/L for polymyxin B, 32 and 16 mg/L for imipenem and  $>512$  and 16 mg/L for amikacin. Both strains had MICs of 32 for meropenem and ceftazidime,  $\leq 0.0625$  for tigecycline and  $\geq 32$  mg/L for rifampicin.

In TKS, no antimicrobial alone showed bactericidal activity against any of CRAB strains. Synergism between polymyxin B at a concentration of 1x MIC and meropenem was observed in both strains, but only in strain 2 for imipenem. No synergism was detected between carbapenems and polymyxin B at subinhibitory concentrations in strain 2. Synergism between ceftazidime was only noted in strain 2 at a concentration of 1x MIC of polymyxin B.

Tigecycline, amikacin and rifampicin presented synergism in combination with polymyxin B in both strains and at all concentrations of polymyxin B in strain 2 (Table).

#### 4 Discussion

Our study showed that either tigecycline, amikacin or rifampicin in combination with polymyxin B were the most active agents, showing bactericidal effects against both strains, even at subinhibitory concentrations of polymyxin B against one strain. It should be noted that both isolates were highly resistant to amikacin and rifampicin, but when these drugs at concentrations lower than their MICs were combined with polymyxin B, a strong bactericidal activity was detected. Synergism between rifampicin and both polymyxin B and colistin has been shown in other studies [8-12], but only one study has assessed the combination of amikacin with polymyxin B in *P. aeruginosa* [13], and none against *A. baumannii*. This latter combination may be less clinically attractive considering its potential for renal toxicity of both drugs.

The combination of tigecycline with polymyxin B was highly bactericidal against both isolates in our study, even at subinhibitory concentration of the latter drug in one isolate. In fact, the tigecycline MICs of our CRAB isolates were very low, but tigecycline presents only bacteriostatic activity *in vitro* [7]. The combination of this drug with polymyxins has been assessed against *Enterobacteriaceae* [14], with synergistic effect demonstrated, and in one experimental study with *A. baumannii* showing it may be a promising alternative in combination with polymyxins for the treatment of pneumonia caused by CRAB [15].

Beta-lactams agents were less effective in our study in combination with polymyxin B, with no drug showing synergistic effect when combined with subinhibitory concentration of polymyxin B. Imipenem and ceftazidime were only synergistic in strain 2, and interestingly,

although meropenem has synergism with polymyxin B in strain 1, imipenem has no synergic effect against this strain.

Although our study was limited by the evaluation of only two strains, it evaluated the combination of polymyxin B with several drugs, many no class-related, only at non-bactericidal concentrations of each drug alone. It also provided data about OXA-23-producing isolates, which is the most common mechanism determining carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide [2].

In summary, even though some synergism has been observed with beta-lactams, our *in vitro* study showed that tigecycline, amikacin and rifampicin were the most active agents in combination with polymyxin B, as demonstrated by a strong bactericidal effect even at subinhibitory concentration of the latter. These agents may show a beneficial effect when combined with polymyxin B in the treatment of OXA-23-producing CRAB and it warrants confirmation in further experimental and clinical studies.

*Acknowledgements:* We are very grateful to Dr. Andreza F. Martins for kindly providing the isolates for this study.

*Funding:* Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (11-0252) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (11/0898-3).

*Competing interests:* A. P. Z. is a research fellow from CNPq (305263/2011-0) and has received consultancy fees from Pfizer, Eurofarma and Forest Laboratories. All other authors: none to declare.

*Ethical approval:* This study was approved by the ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



## References

1. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:71–93.
2. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:8-14.
3. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74:213-23.
4. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10:1393-404.
5. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL; CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 2012;40:108-12.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 20<sup>th</sup> edition: approved standard M07-A8. CLSI, Wayne, PA.
7. Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ, et al. *In vitro* activities of carbapenem/ sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:317–22.
8. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. *In vitro* double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:753–7.

9. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:224–8.
10. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:117–20.
11. Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Del Favero A, Bistoni F. Evaluation of the activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:270–1.
12. Lim T-P, Tan T-Y, Lee W, Sasikala S, Tan T-T, Hsu LY, et al. *In-Vitro* Activity of Polymyxin B, Rifampicin, Tigecycline Alone and in Combination against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *PLoS ONE* 2011;6:18485.
13. Lim T-P, Lee W, Tan T-Y, Sasikala S, Teo J, Hsu LY, et al. Effective Antibiotics in Combination against Extreme Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *PLoS ONE* 2011; 6:e28177.
14. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:244-7.
15. Yilmaz EM, Sunbula M, Aksoyb A, Yilmaza H, Guneyc AK, Guvencd T. Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40: 332-6.

**Table 1.** The 24 hour change in bacterial count after exposure to polymyxin B combined with other antimicrobials against the two strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.

Strain	Agent in combination	Log $\Delta$ (log <sub>10</sub> CFU/ml) <sup>a</sup> for isolate		
		Polymyxin B		
		1/4x MIC	1/2x MIC	1x MIC
01	meropenem	-	-	<b>-7.9977082</b>
	imipenem	-	-	-0.88345
	ceftazidime	-	-	-0.15101
	tigecycline	-	-	<b>-9.95750177</b>
	amikacin	-	-	<b>-9.11335686</b>
	rifampicin	-	-	<b>-9.931542619</b>
02	meropenem	-1.9256176	0.14272336	<b>-4.7447275</b>
	imipenem	0.17405709	0.30103	<b>-10.042688</b>
	ceftazidime	0.18452443	-0.98097676	<b>-8.2483788</b>
	tigecycline	<b>-11.06188073</b>	<b>-11.0122806</b>	<b>-11.11013828</b>
	amikacin	<b>-10.0735774</b>	<b>-10.91833</b>	<b>-11.3776389</b>
	rifampicin	<b>-9.96721</b>	<b>-10.0555</b>	<b>-10.2596</b>

-, not performed.

<sup>a</sup> Log  $\Delta$  (Final inoculum of the combined drugs – Final inoculum of the most active drug in combination [ $\log_{10}$  CFU/ml]). Synergy highlighted in bold was defined as a  $\geq 2$  log<sub>10</sub> decrease in colony count after 24 h by the combination compared with the most active single agent. Bactericidal activity was defined as a  $\geq 3$  log<sub>10</sub> decrease in colony count after 24.

## 7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

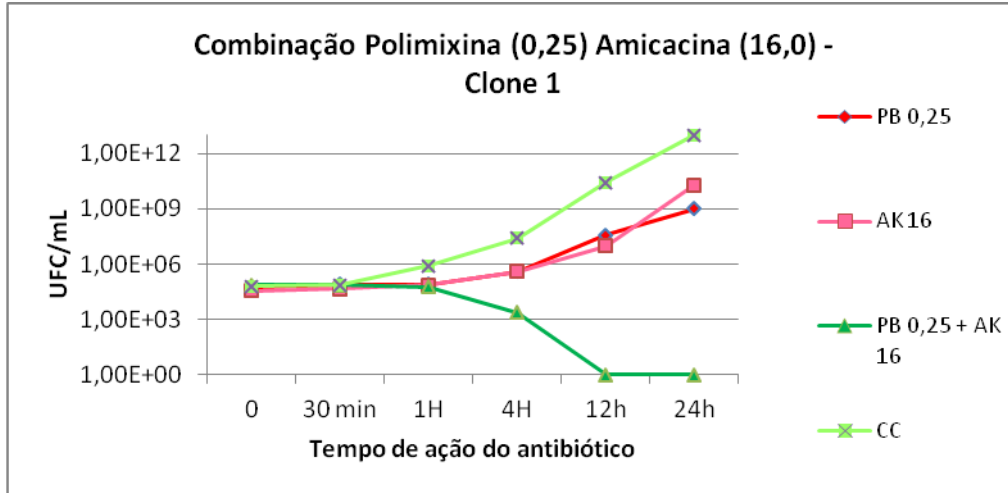
*A.baumannii* é o mais importante patógeno de infecções nosocomiais em todo o mundo, sendo que o aumento da resistência à maioria das classes de antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, têm sido preocupante (26,76). Dentro desse contexto a terapia combinada tem sido investigada como uma opção, a fim de aumentar a eficácia de tratamento para essas infecções, conforme tem sido descrito em alguns estudos (14,15,17,18,110,112-118).

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a combinação de polimixina B com outros antimicrobianos, em dois isolados de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos utilizando a técnica de Time-Kill Curves.

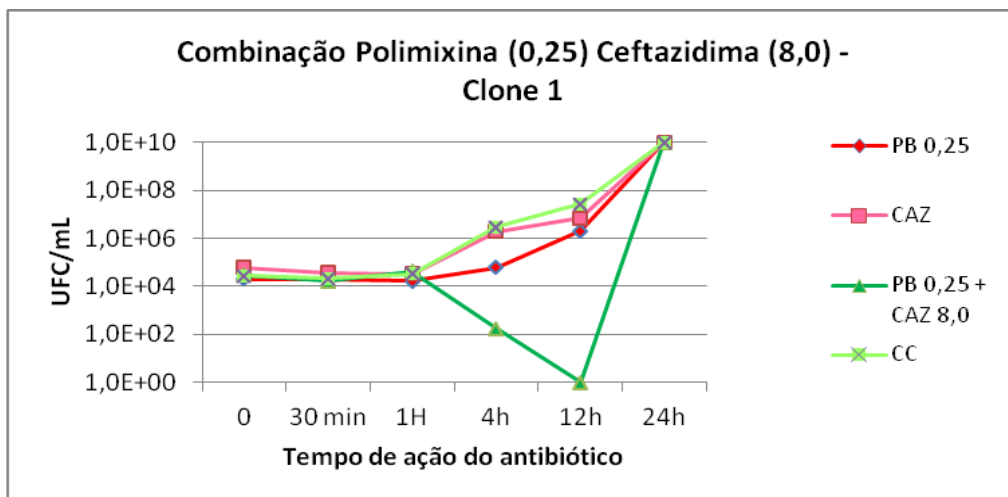
A polimixina B foi combinada em concentrações da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e subinibitórias e com outros antimicrobianos sendo estes em concentrações fixas. Foram combinados com a polimixina B: amicacina, ceftazidima, tigeciclina, rifampicina, imipinem e meropenem. Entre as combinações de antimicrobianos, a combinação de polimixina B com tigeciclina, amicacina e rifampicina, mostraram sinergismo e efeito bactericida, inclusive em concentrações subinibitórias. Cabe ressaltar que ambos clones apresentaram CIM elevadas para amicacina e rifampicina. Embora a associação de polimixina B com  $\beta$ -lactâmicos, tenha sido menos eficaz, houve sinergismo da combinação com ceftazidima e imipinem, apenas contra um isolado, enquanto meropenem combinado com polimixina B teve sinergismo com outro isolado.

Embora nosso estudo tenha a limitação de ter sido testado apenas contra dois isolados, acreditamos que nossos resultados *in vitro*, podem vir a contribuir no tratamento de infecções causadas por ABRC produtor de OXA-23. É importante que mais estudos tanto clínicos quanto *in vitro* sejam realizados a fim de se ter mais dados sobre a eficácia da combinação destes antimicrobianos em infecções bacterianas.

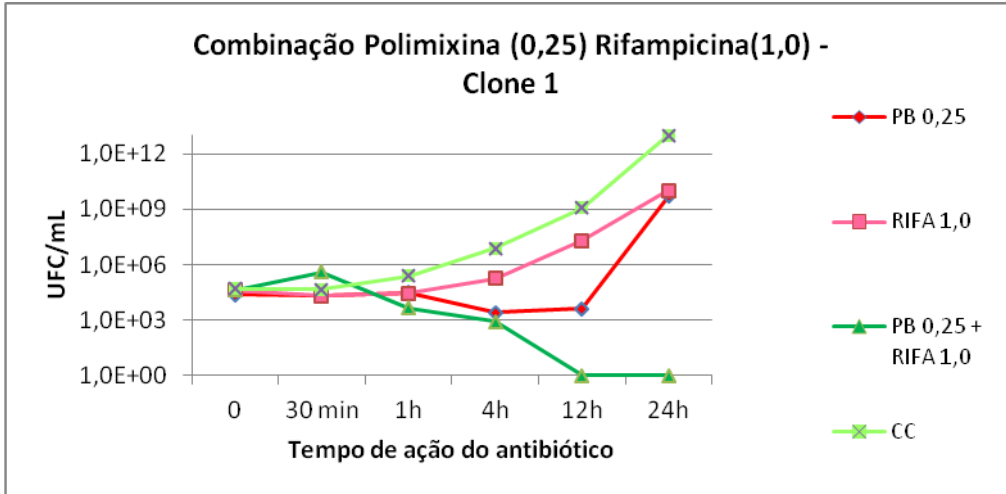
**Gráficos de experimentos de Curva-Tempo Morte Bacteriana (Time Kill Studies)**



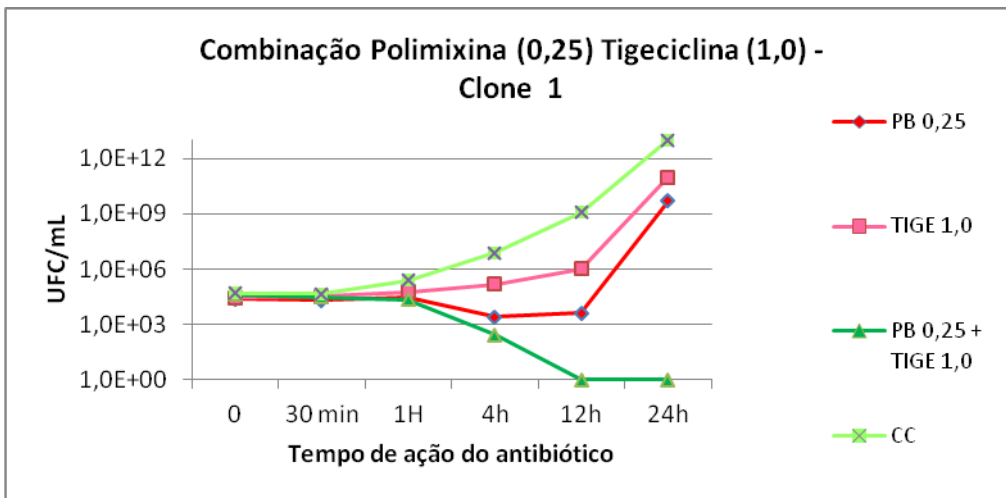
	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	5,70E+04	8,10E+04	7,80E+04	4,00E+05	3,70E+07	1,00E+09
AK 16	3,50E+04	4,60E+04	7,20E+04	3,80E+05	1,00E+07	2,00E+10
PB 0,25 + AK 16	7,40E+04	7,40E+04	5,70E+04	2,30E+03	1,00E+00	1,00E+00
CC	6,30E+04	7,40E+04	7,80E+05	2,50E+07	2,70E+10	1,00E+13



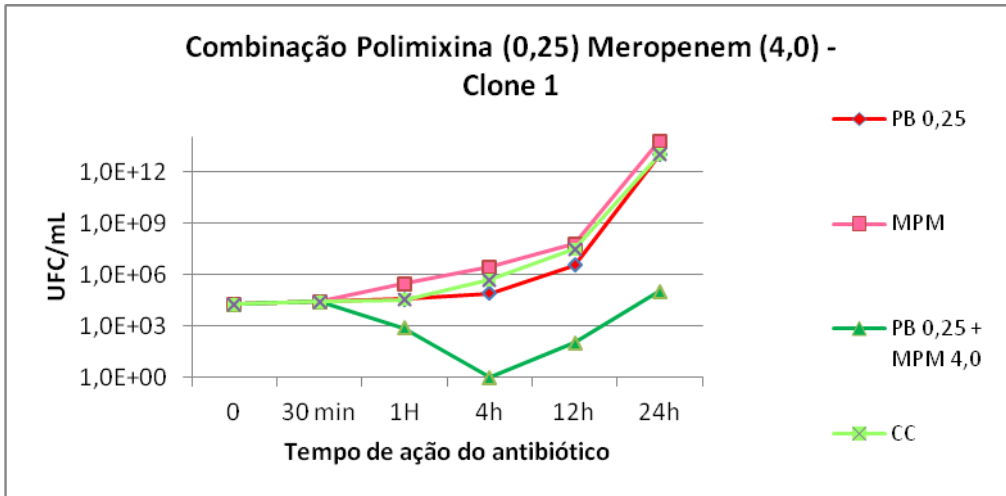
	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	2,0E+04	1,9E+04	1,7E+04	6,0E+04	2,0E+06	1,0E+10
CAZ	5,9E+04	3,8E+04	3,2E+04	2,0E+06	7,0E+06	1,0E+10
PB 0,25 + CAZ 8,0	2,9E+04	1,7E+04	4,1E+04	1,8E+02	1,0E+00	1,0E+10
CC	2,8E+04	2,2E+04	3,3E+04	3,0E+06	2,7E+07	1,0E+10



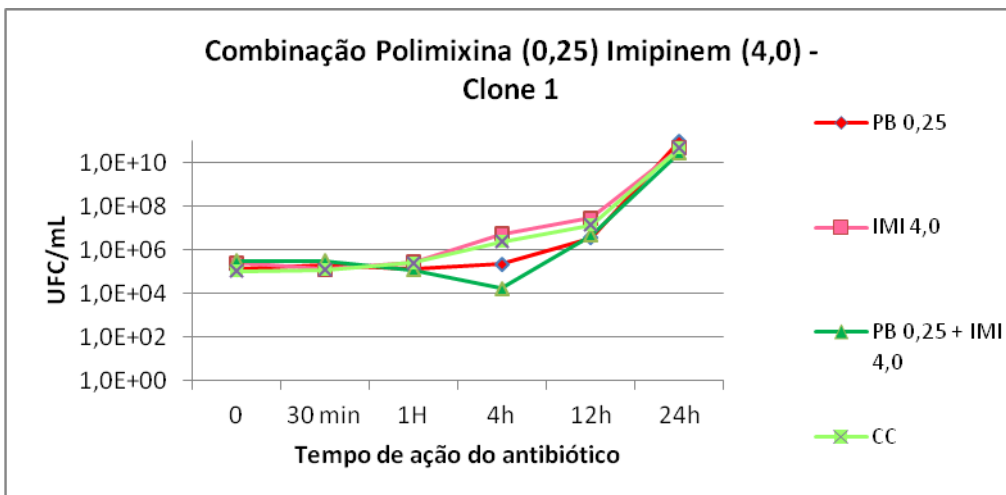
	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	2,4E+04	2,0E+04	3,0E+04	2,5E+03	4,0E+03	5,0E+09
RIFA 1,0	4,3E+04	2,0E+04	2,8E+04	1,8E+05	2,0E+07	1,0E+10
PB 0,25 + RIFA 1,0	4,1E+04	3,9E+05	4,5E+03	8,0E+02	1,0E+00	1,0E+00
CC	4,9E+04	4,6E+04	2,5E+05	7,8E+06	1,2E+09	1,0E+13



	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	2,4E+04	2,0E+04	3,0E+04	2,5E+03	4,0E+03	5,0E+09
TIGE 1,0	2,8E+04	3,4E+04	5,6E+04	1,5E+05	1,0E+06	1,0E+11
PB 0,25 + TIGE 1,0	4,3E+04	3,1E+04	2,3E+04	2,8E+02	1,0E+00	1,0E+00
CC	4,9E+04	4,6E+04	2,5E+05	7,8E+06	1,2E+09	1,0E+13

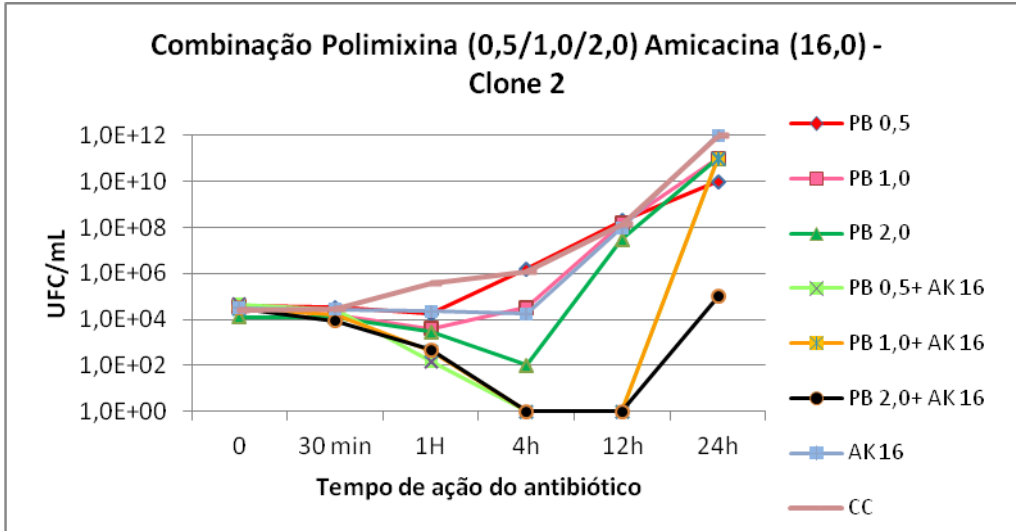


	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	1,9E+04	2,5E+04	3,8E+04	7,8E+04	3,6E+06	1,0E+13
MPM	1,8E+04	2,5E+04	3,0E+05	2,8E+06	6,0E+07	6,0E+13
PB 0,25 + MPM 4,0	1,9E+04	2,7E+04	7,3E+02	1,0E+00	1,0E+02	1,0E+05
CC	1,8E+04	2,5E+04	3,4E+04	4,7E+05	3,0E+07	1,0E+13

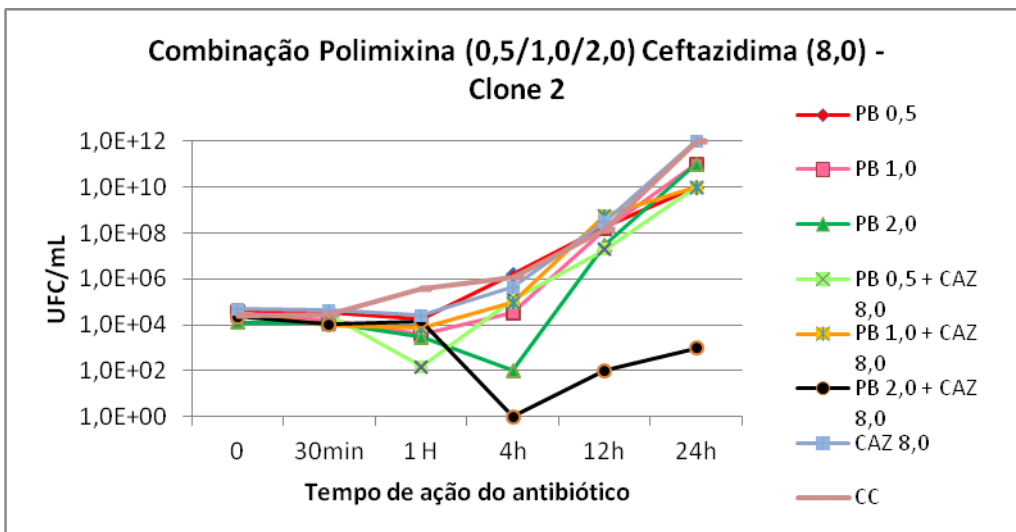


	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,25	1,4E+05	1,9E+05	1,4E+05	2,3E+05	3,6E+06	1,0E+11
IMI 4,0	2,6E+05	1,3E+05	2,8E+05	5,6E+06	3,0E+07	5,0E+10
PB 0,25 + IMI 4,0	3,2E+05	3,1E+05	1,2E+05	1,8E+04	4,8E+06	3,1E+10
CC	1,1E+05	1,2E+05	2,5E+05	2,5E+06	1,4E+07	5,0E+10

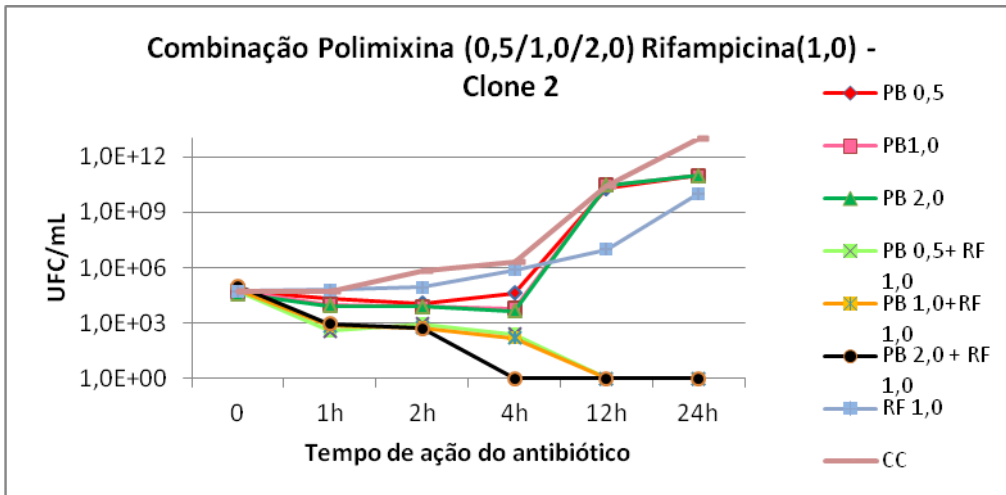




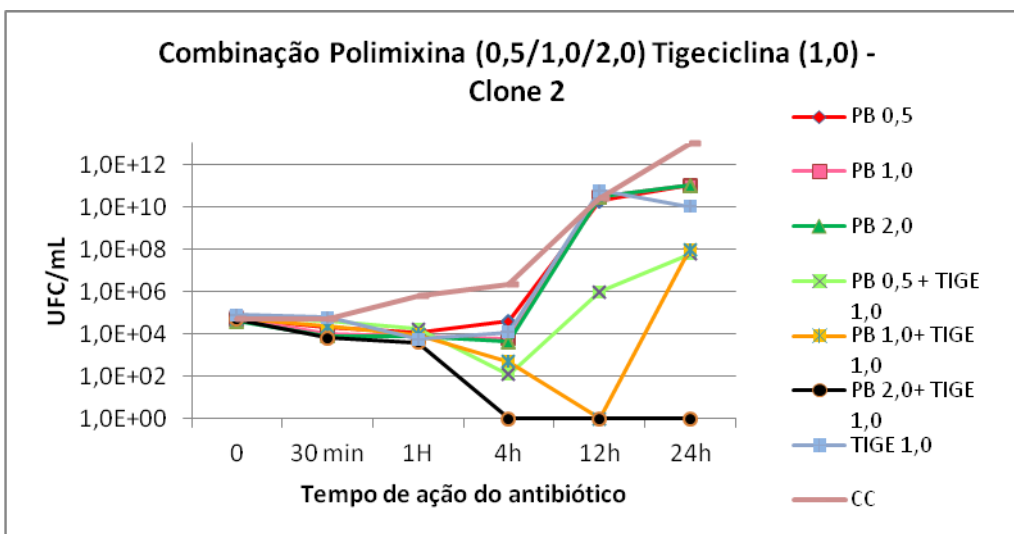
	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,5	3,9E+04	3,3E+04	1,8E+04	1,5E+06	2,0E+08	1,0E+10
PB 1,0	3,5E+04	1,5E+04	4,0E+03	3,3E+04	1,5E+08	1,0E+11
PB 2,0	1,3E+04	1,3E+04	2,9E+03	1,0E+02	3,0E+07	1,0E+11
PB 0,5+ AK 16	4,6E+04	2,5E+04	1,5E+02	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+11
PB 1,0+ AK 16	2,9E+04	1,7E+04	4,3E+02	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+11
PB 2,0+ AK 16	3,0E+04	8,7E+03	4,7E+02	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+05
AK 16	3,2E+04	2,8E+04	2,3E+04	1,8E+04	1,0E+08	1,0E+12
CC	2,6E+04	3,0E+04	3,6E+05	1,3E+06	1,4E+08	1,0E+12



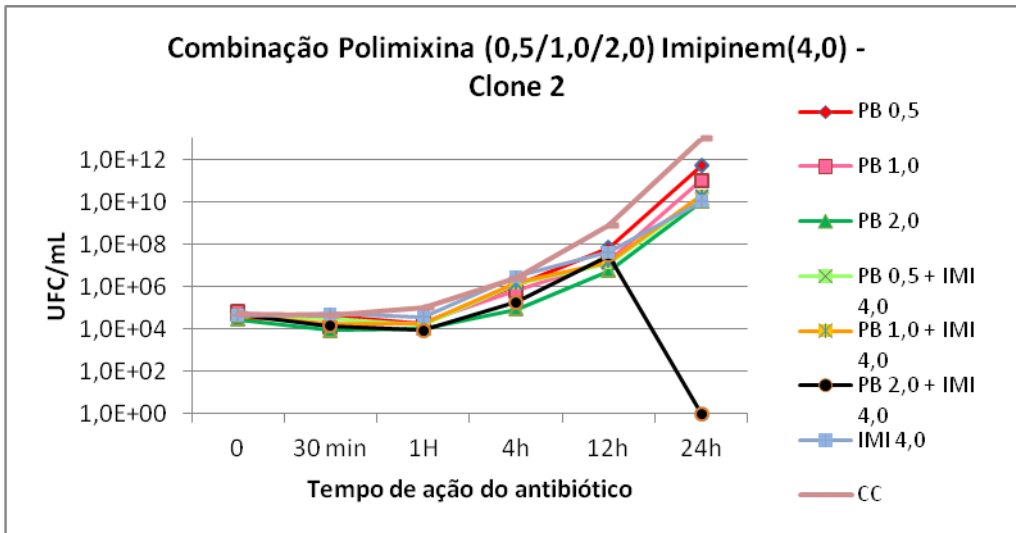
	0	30min	1 H	4H	12H	24H
PB 0,5	3,9E+04	3,3E+04	1,8E+04	1,5E+06	2,0E+08	1,0E+10
PB 1,0	3,5E+04	1,5E+04	4,0E+03	3,3E+04	1,5E+08	1,0E+11
PB 2,0	1,3E+04	1,3E+04	2,9E+03	1,0E+02	3,0E+07	1,0E+11
PB 0,5 + CAZ 8,0	2,6E+04	2,8E+04	1,5E+02	1,3E+05	2,0E+07	1,0E+10
PB 1,0 + CAZ 8,0	3,4E+04	9,6E+03	7,0E+03	9,5E+04	6,0E+08	1,0E+10
PB 2,0 + CAZ 8,0	2,3E+04	1,1E+04	1,4E+04	1,0E+00	1,0E+02	1,0E+03
CAZ 8,0	5,0E+04	4,2E+04	2,6E+04	4,4E+05	3,0E+08	1,0E+12
CC	2,6E+04	3,0E+04	3,6E+05	1,3E+06	1,4E+08	1,0E+12



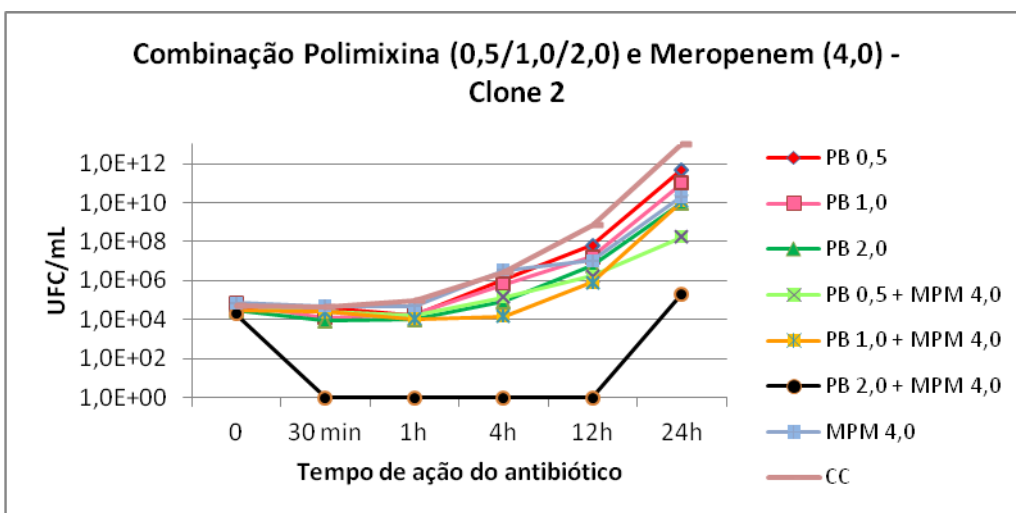
	0	30min	1H	4H	12H	24H
PB 0,5	5,4E+04	2,2E+04	1,1E+04	4,0E+04	2,0E+10	1,0E+11
PB 1,0	5,2E+04	1,0E+04	7,9E+03	6,0E+03	3,0E+10	1,0E+11
PB 2,0	3,9E+04	8,2E+03	7,7E+03	4,4E+03	3,0E+10	1,0E+11
PB 0,5+ RF 1,0	5,1E+04	3,8E+02	9,2E+02	2,5E+02	1,0E+00	1,0E+00
PB 1,0+RF 1,0	6,3E+04	7,0E+02	5,5E+02	1,5E+02	1,0E+00	1,0E+00
PB 2,0 + RF 1,0	1,0E+05	9,0E+02	5,0E+02	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00
RF 1,0	5,5E+04	6,3E+04	8,5E+04	7,4E+05	1,0E+07	1,0E+10
CC	5,0E+04	5,3E+04	6,4E+05	2,2E+06	2,5E+10	1,0E+13



	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,5	5,4E+04	2,2E+04	1,1E+04	4,0E+04	2,0E+10	1,0E+11
PB 1,0	5,2E+04	1,0E+04	7,9E+03	6,0E+03	3,0E+10	1,0E+11
PB 2,0	3,9E+04	8,2E+03	7,7E+03	4,4E+03	3,0E+10	1,0E+11
PB 0,5 + TIGE 1,0	6,3E+04	3,8E+04	1,7E+04	1,2E+02	1,0E+06	6,0E+07
PB 1,0+ TIGE 1,0	5,4E+04	2,2E+04	9,4E+03	5,0E+02	1,0E+00	1,0E+08
PB 2,0+ TIGE 1,0	5,0E+04	6,4E+03	4,0E+03	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00
TIGE 1,0	7,9E+04	6,0E+04	5,8E+03	1,2E+04	6,0E+10	1,0E+10
CC	5,0E+04	5,3E+04	6,4E+05	2,2E+06	2,5E+10	1,0E+13



	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,5	2,8E+04	4,0E+04	1,7E+04	1,2E+06	6,7E+07	5,0E+11
PB 1,0	6,5E+04	1,3E+04	2,0E+04	6,3E+05	1,7E+07	1,0E+11
PB 2,0	2,8E+04	8,5E+03	1,0E+04	8,6E+04	5,6E+06	1,0E+10
PB 0,5 + IMI 4,0	4,3E+04	3,2E+04	1,7E+04	1,4E+06	1,3E+07	1,5E+10
PB 1,0 + IMI 4,0	4,3E+04	1,8E+04	1,8E+04	1,5E+06	1,4E+07	2,0E+10
PB 2,0 + IMI 4,0	4,7E+04	1,4E+04	8,5E+03	1,9E+05	3,1E+07	1,0E+00
IMI 4,0	4,3E+04	5,2E+04	3,7E+04	3,0E+06	4,3E+07	1,0E+10
CC	4,8E+04	4,6E+04	1,0E+05	2,7E+06	7,2E+08	1,0E+13



	0	30 min	1H	4H	12H	24H
PB 0,5	2,8E+04	4,0E+04	1,7E+04	1,2E+06	6,7E+07	5,0E+11
PB 1,0	6,5E+04	1,3E+04	2,0E+04	6,3E+05	1,7E+07	1,0E+11
PB 2,0	2,8E+04	8,5E+03	1,0E+04	8,6E+04	5,6E+06	1,0E+10
PB 0,5 + MPM 4,0	5,5E+04	2,7E+04	1,7E+04	1,4E+05	1,7E+06	1,8E+08
PB 1,0 + MPM 4,0	3,1E+04	2,6E+04	1,1E+04	1,5E+04	7,8E+05	1,2E+10
PB 2,0 + MPM 4,0	2,0E+04	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	2,0E+05
MPM 4,0	7,2E+04	4,8E+04	4,8E+04	3,5E+06	1,1E+07	2,0E+10
CC	4,8E+04	4,6E+04	1,0E+05	2,7E+06	7,2E+08	1,0E+13

Legenda:

PB=Polimixina B

AK=Amicacina

CAZ= Ceftazidima

TIGE= Tigeciclina

RIFA= Rifampicina

IMI= Imipinem

MPM= Meropenem

CC= Controle de Crescimento bacteriano sem antimicrobiano