

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

**ATIVIDADE DA POLIMIXINA B ISOLADAMENTE E EM COMBINAÇÃO COM  
TIGECICLINA, MEROPENEM E ERTAPENEM FRENTE A ISOLADOS DE  
*ENTEROBACTER SP. RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS***

PAOLA HOFF ALVES

Porto Alegre

2016

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

**ATIVIDADE DA POLIMIXINA B ISOLADAMENTE E EM COMBINAÇÃO COM  
TIGECICLINA, MEROPENEM E ERTAPENEM FRENTE A ISOLADOS DE  
*ENTEROBACTER SP. RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS***

PAOLA HOFF ALVES

Orientador: Prof. Dr. Afonso Barth

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andreza Martins

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

Porto Alegre

2016



## **BANCA EXAMINADORA**

Professor Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez

Professor Dr. Alexandre Zavascki

Professor Dr. Alexandre Fuentefria

Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Pitombeira Rigatto

## RESUMO

Diante do aumento global da resistência microbiana, cada vez mais as combinações de antimicrobianos são utilizadas na tentativa de obter uma atividade sinérgica eficaz que possa ser utilizada na prática clínica. O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade de polimixina B isoladamente e em combinação com tigeciclina e carbapenêmicos (ertapenem e meropenem), frente a isolados de *Enterobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos. Foram selecionados quatro isolados de *Enterobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos, sendo três isolados produtores de carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48-like) e um não produtor de carbapenemases (NPC). A avaliação da atividade sinérgica antimicrobiana foi realizada por ensaio de *time-kill* com as seguintes concentrações de cada antimicrobiano: tigeciclina 1mg/L, meropenem 1mg/L e ertapenem 0,5mg/L, que correspondem aos pontos de corte de sensibilidade do CLSI (2016). Para polimixina B, foram utilizadas diferentes concentrações de acordo com o perfil de susceptibilidade do isolado: para os isolados sensíveis, utilizou-se 0,5x; 1x e 2x a CIM do isolado; para o isolado resistente, foram utilizados 0,5x; 1x e 2x o ponto de corte de sensibilidade do CLSI (2 mg/L). Foi considerada sinérgica a combinação com redução  $\geq 2$  logs do inóculo inicial em comparação ao antimicrobiano sozinho mais ativo. As combinações de polimixina B em diferentes concentrações (0,5; 1 e 2mg/L) com meropenem apresentaram atividade sinérgica para a cepa produtora de NDM (CIM polimixina B 1 mg/L; CIM meropenem 8 mg/L). As combinações de polimixina B com tigeciclina foram sinérgicas apenas na concentração de polimixina B de 0,125 mg/L para cepa produtora de OXA-48-like (CIM polimixina B 0,25 mg/L; CIM tigeciclina 2 mg/L) e na concentração de 1 mg/L para a cepa produtora de NDM. Para a cepa NPC (CIM polimixina B 0,5 mg/L; CIM tigeciclina 4 mg/L; CIM meropenem 4 mg/L), apenas a tripla combinação com polimixina B (1 mg/L), tigeciclina e meropenem apresentou atividade sinérgica. A combinação de dois carbapenêmicos não apresentou atividade sinérgica para nenhum isolado, porém, quando acrescentado tigeciclina ao esquema, observou-se sinergismo no isolado produtor de OXA-48-like, o que leva ao questionamento da efetividade da terapia “carbapenem suicida”. Para o isolado produtor de KPC e com padrão de resistência a polimixina B, nenhuma das combinações testadas apresentou sinergismo. Esta situação é bastante preocupante devido à alta prevalência de infecções por bactérias produtoras de KPC nos hospitais brasileiros, juntamente com as crescentes taxas de resistência as polimixinas.

**Palavras-chave:** Sinergismo; carbapenemases; polimixina B; tigeciclina; combinação de carbapenêmicos; *Time-kill*.

## ABSTRACT

Due to the increase in microbial resistance, combinations of antimicrobials are increasingly being used to improve the therapeutic response. The objective of this study was to compare the activity of polymyxin B alone and in combination with tigecycline and carbapenem (ertapenem and meropenem) against carbapenem-resistant *Enterobacter* sp isolates. Four isolates were selected, three were carbapenemase-producing (KPC, NDM, OXA-48-like) and a non-carbapenemase-producing (NCP). The evaluation of synergistic antimicrobial activity was performed by time-kill assay with the following concentrations of each antimicrobial: tigecycline 1mg/L, meropenem 1mg/L and ertapenem 0.5mg/L, which correspond to the breakpoints of CLSI (2016). For polymyxin B, different concentrations were used according to the susceptibility profile of the isolate: for susceptible isolates, it was used 0.5x; 1x and 2x the MIC of the isolate, for the resistant isolates it was used 0.5x; 1x and 2x the breakpoint of CLSI (2 mg/L). The combination with reduction  $\geq 2$  logs of the initial inoculum compared to the most active antimicrobial alone was considered synergies. Combinations of polymyxin B at different concentrations (0.5; 1 and 2 mg/L) with meropenem showed synergistic activity for the NDM-producing isolate (MIC polymyxin B 1 mg/L, MIC meropenem 8 mg/L). Combinations of polymyxin B with tigecycline were synergistic only at the concentration of polymyxin B of 0.125 mg/L for the OXA-48-like-producing isolate (MIC polymyxin B 0.25 mg/L, MIC tigecycline 2 mg/L) and at the concentration of 1 mg/L for the NDM-producing isolate. For the NCP isolate (MIC polymyxin B 0.5 mg/L; MIC tigecycline 4 mg/L; MIC meropenem 4 mg/L), only the triple combination of polymyxin B (1 mg/L) plus tigecycline and meropenem presented synergistic activity. The combination of two carbapenems was not synergic for the four isolates; however, when tigecycline was added to the regimen, synergies for the OXA-48-like-producing isolate were observed. Therefore, the so called, "carbapenem suicide" therapy was not effective in vitro against our isolates. For the KPC-producing isolate that it is polymyxin B resistant, none of the combinations tested showed synergies. This situation is very worrisome due to high prevalence of infections by KPC-producing in the Brazilian hospitals, associate with the increasing rates of polymyxins resistance.

**Keywords:** Synergism; carbapenems; polymyxin; tigecycline; double Carbapenems; time-Kill.

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

- Figura 1. Estratégias de busca de referências que embasaram este estudo. ....16
- Figura 2. Explicação do Marco-Teórico.....27

### ARTIGO 1

- Figure 1:** Time-kill performed in cation-adjusted Mueller-Hinton broth at 0.5x, 1x and 2x MIC of polymyxin B to *Enterobacter cloacae* NDM- producing. The antibiotic concentrations of tigecycline and meropenem were 1mg/L. ....51

## LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

### ARTIGO 1

**Table 1.** Evaluation of bactericidal activity in 24h and synergism by Time Kill assay of carbapenemase producing and non-producing *Enterobacter* sp. Isolates .....**49**

### ARTIGO 2

**Table 1:** Evaluation of bactericidal activity in 24h and synergism by Time Kill assay of carbapenemase producing and non-producing *Enterobacter* sp. isolates .....**55**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	–	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	–	Concentração inibitória mínima
CLSI	–	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ESBL	–	Beta-lactamase de espectro estendido
HFIM	–	<i>Hollow-fiber infection model</i>
KPC	–	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
NDM	–	<i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i>
NHSN	–	<i>National Healthcare Safety Network</i>
TKC	–	<i>Time kill curves</i>
UFC	–	Unidade formadora de colônia
UTI	–	Unidade de Tratamento Intensivo
VIM	–	<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Afonso Barth e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza Martins, pela confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Além disso, o profissionalismo e a competência de vocês inspiram alunos como eu há fazer cada dia mais ciência.

Aos colegas do LABRESIS, especialmente às colegas Natália Barth, Camila Wilhelm e a Laura Czerster, pelos ensinamentos da técnica e pela grande ajuda na parte prática.

Aos meus colegas do Serviço de Controle de Infecção do Hospital São Lucas da PUCRS, por todo apoio, por toda paciência e motivação para realização deste trabalho.

Aos amigos e profissionais que estiveram comigo, não somente durante o desenvolvimento deste trabalho, mas também ao longo de toda minha trajetória profissional, e que são grandes exemplos de profissionais: Dr.<sup>a</sup> Letícia Lobo, Enf<sup>a</sup> Miriane Melo, Enf<sup>a</sup> Francyne Lopes, Dr. Fabiano Ramos, Dr.<sup>a</sup>. Maria Helena Rigatto, Dr. Alexandre Zavascki e Dr. Gabriel Narvaez.

À minha família: mãe, pai e meus amados avós (Paulo e Iolanda), que me deram a educação, os valores e o apoio para que hoje eu pudesse estar alcançado mais esse objetivo.

Ao meu marido, que é o meu amor, meu companheiro e também minha grande fonte de inspiração pelo homem que és. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e por todo amor.

"A maior vitória é derivada da satisfação interna de saber que você fez o seu melhor e que  
você obteve o máximo daquilo que você deu"

Howard Cosell

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	16
2.2	MICROBIOLOGIA DO GÊNERO <i>ENTEROBACTER</i> .....	16
2.3	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	17
2.3.1	Resistência à Polimixina B .....	19
2.4	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR <i>ENTEROBACTER</i> SP. ....	20
2.4.1	Surtos por <i>Enterobacter</i> sp. ....	21
2.5	ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO FRENTE À RESISTÊNCIA MICROBIANA .....	23
2.6	ATIVIDADE BACTERICIDA E SINERGISMO .....	25
3	MARCO TEÓRICO .....	27
4	JUSTIFICATIVA .....	28
5	OBJETIVOS .....	29
5.1	OBJETIVO GERAL .....	29
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6	REFERÊNCIAS.....	30
7	ARTIGOS.....	41
7.1	ARTIGO 1 .....	41
7.2	ARTIGO 2 .....	52
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
9	ANEXOS.....	57
	ANEXO A: Ensaio <i>time kill curves</i> para cepa de <i>Enterobacter</i> sp. produtora de KPC....	57
	ANEXO B: Ensaio <i>time kill curves</i> para cepa de <i>Enterobacter</i> sp. produtora de NDM...59	
	ANEXO C: Ensaio <i>time kill curves</i> para cepa de <i>Enterobacter</i> sp. produtora de OXA-48 .....	61
	ANEXO D: Ensaio <i>time kill curves</i> para cepa de <i>Enterobacter</i> sp. não produtora de carbapenemase (NPC).....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos são cada vez mais comuns no mundo inteiro<sup>1</sup>. Dentre as enterobactérias, o gênero *Enterobacter* sp. destaca-se por englobar cepas de grande impacto epidemiológico. Apesar das espécies de *Enterobacter* já possuírem diversos mecanismos de resistência intrínsecos, a aquisição de resistência a múltiplos antimicrobianos tem sido cada vez mais observada<sup>2</sup>.

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos em enterobactérias<sup>3</sup>. As carbapenemases se destacam entre as beta-lactamases por possuírem capacidade de inativar os antibióticos carbapenêmicos<sup>4</sup>. As carbapenemases são classificadas de acordo com suas propriedades moleculares e funcionais: classe A, B e D segundo Ambler, sendo as mais prevalentes entre as enterobactérias a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) (classe A), a *New Delhi Metallo-beta-lactamase* (NDM) (classe B) e as Oxacilinas, especialmente a OXA-48 (classe D)<sup>5</sup>.

Serino-carbapenemases da classe A do tipo KPC foram descritas pela primeira vez na Carolina do Norte, Estados Unidos, no ano de 1996<sup>6</sup>, mas disseminaram-se rapidamente pelo mundo com diversos relatos de sua propagação endêmica em países como China, Itália, Polônia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan<sup>6,7</sup>. Infecções por cepas produtoras de KPC não estão associadas a locais, órgãos ou tecidos específicos, mas ocorrem em maior frequência em pacientes hospitalizados, com múltiplos dispositivos invasivos e/ou imunocomprometidos. Outros fatores de risco, como uso prévio de antimicrobianos e internações em unidades de terapia intensiva (UTI), também estão associados a infecções por bactérias produtoras de KPC<sup>8</sup>. Preocupantemente, um estudo de 2008 já demonstrava uma maior mortalidade (33% versus 9%) associada a pacientes infectados por *Enterobacter* sp. resistentes a imipenem e produtores de KPC comparado a pacientes infectados por cepas imipenem-sensíveis<sup>9</sup>.

Decorrente da importante resistência conferida pela produção de KPC, antimicrobianos como a polimixina B, a colistina, fosfomicina, tigeciclina e, por vezes, até mesmo aminoglicosídeos representam a última linha de tratamento para infecções graves por bactérias produtoras desta enzima<sup>10</sup>. Assim, para maximizar a morte bacteriana e minimizar a resistência bacteriana, a terapia combinada de antimicrobianos tem sido utilizada para tratamento de infecções por cepas multirresistentes<sup>11</sup>.

Metallo-beta-lactamases são beta-lactamases da classe B e possuem a peculiaridade de necessitar de um substrato de zinco ou qualquer outro metal pesado como co-fator essencial

para sua atividade. Enzimas desta classe conseguem hidrolisar todos os beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, com exceção dos monobactâmicos<sup>12</sup>. Dentre as metalo-betalactamases, a *New Delhi Metallo-betalactamases* (NDM) é uma das enzimas mais importantes. A NDM foi detectada pela primeira vez em 2008 em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* de um paciente da Suécia que retornava de um procedimento médico na Índia e, desde então, se disseminou pelo mundo<sup>13</sup>. A produção de NDM por cepas de *Klebsiella pneumoniae* é considerada endêmica no subcontinente Indiano, sendo identificada em 75% dos isolados produtores de carbapenemases<sup>14,15</sup>. Assim como para cepas produtoras de KPC, as combinações de antimicrobianos são utilizadas para tratamento de infecções por cepas produtoras de NDM. Os principais antibióticos utilizados em combinação incluem o ciprofloxacino, meropenem, daptomicina, rifampicina, tigeciclina, entre outros<sup>16</sup>.

A classe D de Ambler inclui as beta-lactamases, denominadas de oxacilinases. Já foram descritas mais de 400 variantes das oxacilinases, porém somente algumas possuem atividade de carbapenemase<sup>12</sup>. A OXA-48 foi detectada pela primeira vez em enterobactérias na Turquia, em 2003, sendo uma enzima com maior poder de hidrólise para imipenem e uma das mais prevalentes da classe<sup>17</sup>. Desde 2003, países como Turquia, Índia, Egito, Tunísia e Marrocos possuem índices endêmicos de cepas de enterobactérias produtoras de OXA-48<sup>18</sup>. No Brasil, apenas uma variante de OXA-48 foi descrita até o momento: OXA-370. A enzima foi identificada pela primeira vez no Sul do Brasil no ano de 2013, em um isolado de *Enterobacter hormaechei* proveniente de uma amostra de swab retal<sup>19</sup>. Em uma publicação posterior, um grupo do Rio de Janeiro descreveu a identificação de 24 isolados de enterobactérias com produção de OXA-370 (22 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae* e 1 *Enterobacter aerogenes*) provenientes de cinco hospitais do Rio de Janeiro entre os anos de 2013 e 2014<sup>20</sup>.

Cepas produtoras de OXA-48 usualmente apresentam resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, porém, nas cepas não produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), elas possuem a característica de preservar a sensibilidade as cefalosporinas de amplo espectro<sup>21</sup>. Ao contrário das NDMs e KPCs, o tratamento combinado com carbapenêmicos não parece ser uma opção viável para infecções por cepas produtoras de OXA-48. Um estudo demonstrou que a terapia de combinação com sulbactam, meropenem e colistina foi mais eficaz para cepas produtoras de NDM do que para aquelas produtoras de OXA-48, sugerindo que a identificação do tipo de carbapenemase ajuda a determinar a melhor combinação para o tratamento da infecção<sup>22</sup>.

Estudos clínicos demonstram que a terapia antimicrobiana combinada está associada com melhores resultados em comparação a monoterapia, mesmo com sensibilidade *in vitro* ao antimicrobiano individual<sup>23,24,25</sup>. No entanto, não há estudos suficientes que demonstrem terapia combinada como mais eficaz. As recomendações até o momento baseiam-se em alguns estudos clínicos retrospectivos e em estudos *in vitro* baseados em métodos *time-kill* ou *checkerboard*. Melhores desfechos têm sido reportados em pacientes tratados com combinações de colistina e carbapenêmico, tigeciclina, fosfomicina ou aminoglicosídeo<sup>25,26,27</sup>.

Uma vez conhecida a atividade *in vitro* de alguns antimicrobianos frente a isolados de *Enterobacter* sp. produtores e não produtores de carbapenemases, este estudo busca definir possibilidades de associação de antimicrobianos que possam ser eficazes na presença de diferentes carbapenemases através de ensaio *time kill curves* (TKC).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A estratégia de busca na literatura científica sobre o tema desse estudo envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, Scielo e sites de organizações ligadas a microbiologia e ao tratamento de doenças infecciosas, sem data inicial de publicação até 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “*time-kill*”, “KPC”, “NDM”, “OXA-48”, “*synergism*”, “*double-carbapenem*”, “*Enterobacter*” e combinações, conforme demonstrado na Figura 1. Através da revisão do título e do *abstract* foram escolhidos aqueles artigos de revisão contemplando epidemiologia, detecção e tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, além de artigos originais que avaliaram atividade bactericida e sinergismo em enterobactérias.

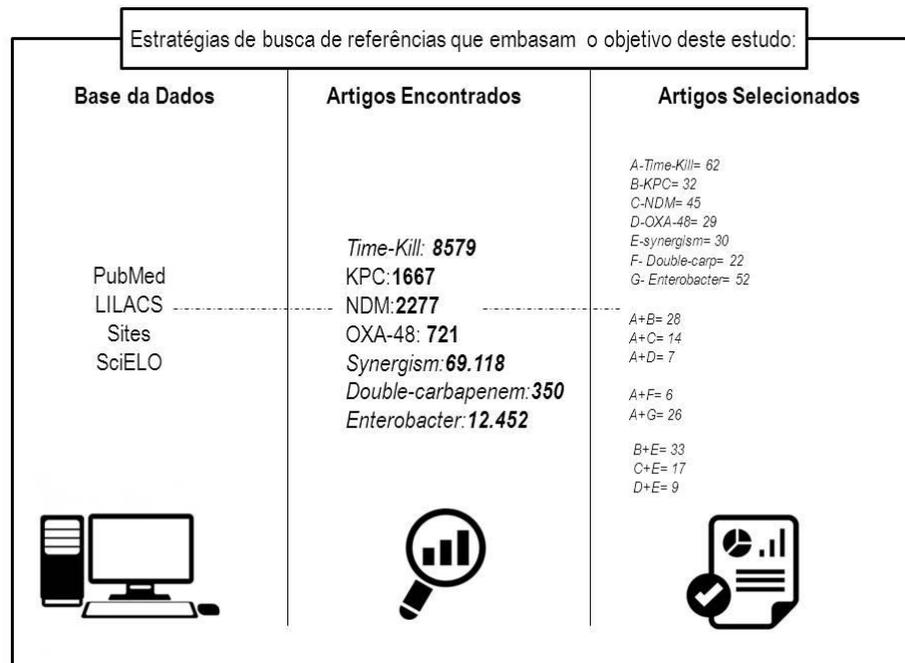


Figura 1. Estratégias de busca de referências que embasaram este estudo.

Fonte: elaborado pela autora.

### 2.2 MICROBIOLOGIA DO GÊNERO *ENTEROBACTER*

Bactérias do gênero *Enterobacter* são gram-negativas, anaeróbicas facultativas pertencentes à família de *Enterobacteriaceae*, amplamente encontradas na natureza. Estes

microrganismos são saprófitas no meio ambiente, uma vez que são encontrados no solo e na água de esgoto, mas também fazem parte da microbiota entérica comensal do trato gastrointestinal humano<sup>28</sup>. O gênero *Enterobacter* foi descrito pela primeira vez por Hormaeche e Edwards, em 1960, e passou por significativas modificações taxonômicas ao longo dos anos<sup>29</sup>.

O Complexo *Enterobacter cloacae* inclui seis espécies: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* e *Enterobacter nimipressuralis*, que estão intimamente relacionadas. O Complexo *Enterobacter cloacae* exibe as mesmas características fenotípicas do gênero *Enterobacter*: catalase positiva, oxidase e DNase negativas, fermentadores da glicose e não-pigmentados. No entanto, apenas o *E. cloacae* e *E. asburiae* podem ser identificados por métodos convencionais<sup>30</sup>. Para identificação das demais espécies, métodos bioquímicos e moleculares – como a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* para os genes 16S rDNA, *hsp60* e *rpoB* – são necessários<sup>31</sup>. A análise do gene 16S rDNA é bastante utilizada para identificação de gênero, mas não consegue diferenciar espécies com estreita semelhança genética. O sequenciamento do fragmento *hsp60* foi o primeiro método genotípico utilizado para identificação das espécies e é considerado um dos melhores métodos para diferenciação das sub-espécies<sup>32</sup>.

Apesar da grande importância clínica como agente causador de infecções nosocomiais, os mecanismos de virulência associados ao *Enterobacter cloacae* ainda não são bem conhecidos. Sabe-se que a sua capacidade de formar biofilmes e secretar uma diversidade de citotoxinas (enterotoxinas, hemolisinas, toxinas de formação de poros) está fortemente envolvida com a sua patogenicidade<sup>33</sup>.

### 2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

As espécies de *Enterobacter* são intrinsicamente resistentes à aminopenicilinas, amoxicilina/ácido clavulânico e às cefalosporinas de primeira geração, devido à expressão cromossômica da beta-lactamase AmpC. Algumas cepas variantes podem sofrer mutação espontânea, ocasionando presença de superexpressão das beta-lactamases do tipo AmpC-. Tal fato torna as cefalosporinas de terceira geração instáveis a estas enzimas, ou seja, tornam-se mais suscetíveis à hidrólise. O resultado é uma falha terapêutica que pode variar de 20-30% em infecções de corrente sanguínea causadas por *Enterobacter* tratadas com cefalosporinas de

terceira geração. No entanto, as cefalosporinas de terceira geração são fracas indutoras da sua síntese<sup>26</sup>.

Em espécies de *Enterobacter*, o mecanismo atual mais importante de resistência é a expressão de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Estas enzimas tornaram-se o segundo maior mecanismo de resistência mediado por plasmídeos e ganharam uma preocupação mundial importante, uma vez que hidrolisam, além das cefalosporinas de terceira geração, as cefalosporinas de quarta geração<sup>31</sup>.

Com a importante disseminação das ESBLs no mundo, observado em 2000 após surto de CTX-M na Argentina, os carbapenêmicos ganharam espaço na terapia dirigida, ou muitas vezes empírica, de infecções por enterobactérias, uma vez que se comportavam de maneira estável frente às ESBLs e enzimas AmpC<sup>34</sup>.

Os carbapenêmicos tiveram sua atividade preservada durante aproximadamente 20 anos após a introdução do imipenem em 1985, mas a resistência a estes fármacos aumentou significativamente nos últimos anos, sendo que se tornou um grande problema atual<sup>35</sup>.

A resistência a carbapenêmicos pode acontecer por perda de porina, redução de permeabilidade de membrana em cepas com alta produção de AmpC ou ESBLs. Contudo, sem dúvida, o mecanismo mais preocupante se dá pela produção de enzimas carbapenemases, que são bioquimicamente diversificadas e incluem membros de três das quatro classes de Ambler: A, B e D<sup>36</sup>.

Em 2001, foi publicado o primeiro caso de uma nova beta-lactamase, denominada *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), na Carolina do Norte (Estados Unidos), enzima cujo perfil de hidrólise inclui os carbapenêmicos, encontrada principalmente em enterobactérias<sup>6</sup>. Atualmente, amostras produtoras de KPC se disseminaram em várias regiões do mundo e se tornaram muito prevalentes em infecções principalmente de pacientes hospitalizados. O nível de resistência aos carbapenêmicos encontrado em amostras produtoras de KPC é variado, sendo o ertapenem o carbapenêmico com menor atividade frente à enzima. Produtores de KPC são, na maioria das vezes, resistentes a múltiplos antibióticos, tornando cada vez mais limitadas as alternativas terapêuticas para infecções por estes patógenos<sup>37</sup>.

Kumarasamy et al., em um estudo publicado na revista *The Lancet Infectious Diseases*, em 2010, relatou que enterobactérias isoladas em dois centros da Índia apresentaram perfil de resistência a todos antimicrobianos, com exceção de tigeciclina e colistina. Grande parte dos isolados apresentava, em seu plasmídeo, um novo gene de resistência, que foi denominado *New Delhi Metallo-Betalactamase* (NDM)<sup>38</sup>. Embora bactérias produtoras de NDM tenham sido identificadas originalmente na Índia, vários relatos

de enterobactérias produtoras de NDM têm sido descritos em várias outras regiões do mundo. Inicialmente, os casos de NDM descritos fora da Índia tinham alguma ligação epidemiológica com o continente Indiano, mas, atualmente, já existem vários relatos de infecções/colonizações por amostras NDM positivas em pacientes de diversos países sem alguma correlação com a Índia. Amostras produtoras de NDM tendem a ser resistentes aos carbapenêmicos e a vários outros antibióticos<sup>13,14,15</sup>.

Além das carbapenemases das classes A (KPC) e B (NDM) de Ambler, as carbapenemases da classe D, especialmente OXA-48 e suas variantes, são cada vez mais descritas em enterobactérias<sup>39</sup>. Embora a enzima OXA-48 seja descrita como menos hidrolítica que KPC e NDM, a mesma pode apresentar atividade significativa de degradação de carbapenêmicos. As consequências clínicas relacionadas à disseminação de produtores de OXA-48 e suas variantes podem ser bastante significativas<sup>31</sup>. Recentemente, estudos demonstraram que o imipenem pode ser usado como tratamento para bacteremias por amostras produtoras de OXA-48 que sejam sensíveis ao imipenem. No entanto, a eficácia do tratamento com carbapenêmicos para produtores de carbapenemases com baixos níveis de resistência ou susceptibilidade a vários carbapenêmicos ainda é discutida, uma vez que há relatos de falha no tratamento com imipenem para várias outras infecções<sup>22, 40, 41</sup>.

### 2.3.1 Resistência à Polimixina B

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos que agem nas membranas celulares, promovendo a diminuição da integridade da parede celular ao interagir com seus fosfolipídios e consequente morte celular bacteriana. O espectro de ação das polimixinas inclui grande parte das bactérias gram-negativas, exceto *Proteus* sp. e *Providência* sp., que apresentam resistência intrínseca a este antimicrobiano<sup>42</sup>. Um estudo do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* demonstrou que a polimixina B ainda parece ter boa atividade bactericida frente a isolados gram-negativos, mesmo estes apresentando resistência aos carbapenêmicos. Porém, nesse mesmo estudo, foi observada uma tendência ao aumento da resistência às polimixinas B entre isolados de *Klebsiella pneumoniae* de hospitais localizados na América Latina<sup>43</sup>.

Tão preocupante quanto o crescente aumento da resistência a carbapenêmicos em enterobactérias é o surgimento da resistência, mediada por plasmídeo, às polimixinas nessas espécies. Historicamente, a resistência à polimixina em *Enterobacteriaceae* ou era intrínseca ou adquirida através de mutação cromossômica.

A regulação gênica do desenvolvimento de resistência às polimixinas mais conhecida até o momento envolve o sistema de dois componentes, PhoPQ e PmrAB. Tais sistemas são utilizados por diversas espécies bacterianas para regulação de expressão de diferentes fatores de resistência e virulência. Fatores ambientais como presença de ferro, concentrações elevadas de cálcio ou baixas de magnésio e também alterações no pH do meio podem influenciar esses sistemas. O sistema de dois componentes é constituído por uma proteína sensor de histidina quinase que percebe estímulos ambientais, sofrendo uma reação de autofosforilação, ativando uma segunda proteína citoplasmática. Esta, por sua vez, promove a ativação ou repressão dos genes alvos, desencadeando a resistência as polimixinas<sup>44</sup>. Alguns trabalhos com espécies de *Klebsiella* demonstraram a participação dos sistemas PhoPQ e PmrAB em diferentes condições ambientais para o desenvolvimento de resistência às polimixinas através da modificação do lipídio A<sup>45,46</sup>. No Reino Unido e na Irlanda, dados já demonstram uma resistência de 7 e 14% à colistina em isolados de *Enterobacter* sp. no sangue e trato respiratório<sup>50</sup>. Da mesma forma, em 2008 15% dos isolados de *Enterobacter* sp. já eram resistentes à colistina no Canadá<sup>51</sup>.

O paradigma da resistência as polimixinas foi recentemente alterado com a descoberta de um gene de resistência, o *mcr-1*, codificado no plasmídeo de uma cepa de *E. coli* na China. Durante um projeto de vigilância epidemiológica que avaliava resistência microbiana em cepas de *E. coli* oriundas de alimentos e de animais, foi observado um aumento no nível de resistência à colistina. Em análise mais aprofundada, os pesquisadores depararam-se com mecanismo que era transmissível para outras cepas, chegando ao gene *mcr-1* plasmidial. O *mcr-1* codifica uma fosfoetanolamina-transferase, resultando na adição de fosfoetanolamina no lipídio A<sup>47, 48, 49</sup>.

## **2.4 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR *ENTEROBACTER* SP.**

Espécies de *Enterobacter* têm sido frequentemente relacionadas com a ocorrência de surtos, principalmente em UTIs. Além disso, é grande a preocupação com o aumento das infecções por estes patógenos em unidades de internação clínica, uma vez que ocorreu um importante aumento do consumo de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos na terapia antimicrobiana, não sendo, atualmente, o uso de terapia antimicrobiana prévia fator de risco para desenvolvimento de resistência, diretamente relacionado à pacientes de unidades críticas<sup>52,53</sup>.

Embora o *E. aerogenes* seja descrito como principal causador de choque séptico e, conseqüentemente, taxas maiores de mortalidade, o *E. cloacae* é atualmente a espécie do gênero *Enterobacter* mais prevalente em amostras clínicas<sup>54</sup>. O *E. cloacae* é responsável por infecções nosocomiais importantes, como: endocardites, osteomielites, artrites sépticas, entre outros<sup>54</sup>.

De acordo com relato do *National Healthcare Safety Network* (NHSN) do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), referente às infecções em hospitais norte-americanos no ano de 2009-2010, o gênero *Enterobacter* sp. aparece como oitavo microrganismo mais frequente, sendo responsável por 4,7% das infecções notificadas. O percentual de resistência aos carbapenêmicos entre os isolados variou entre 1,1 e 6,2%<sup>55</sup>. Em comparação, os dados do SENTRY de 2012 (*Antimicrobial Surveillance Program*) em hospitais latino-americanos demonstram o gênero *Enterobacter* como quinto mais frequente causador de infecções nosocomiais, sendo o Brasil o país com o maior número de isolados. Nesse estudo, foi constatada que taxas de resistência de *Enterobacter* sp. a carbapenêmicos variam em torno de 8%. Os dados do SENTRY mostraram um crescente aumento nas taxas de resistência aos carbapenêmicos também entre espécies de *Klebsiella* sp.: de 0,5% no período de 1990-1997 para 8,6% nos anos entre 2008-2010, demonstrando o importante papel epidemiológico que as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos vêm ocupando no cenário hospitalar<sup>56</sup>. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reportou o *Enterobacter* sp. como o oitavo microrganismo mais frequente em infecções de corrente sanguínea associadas à cateter nos hospitais brasileiros em 2014. Comparado aos anos de 2012 e 2013, que, respectivamente, apontaram uma resistência de 11,4 e 17,2% de espécies de *Enterobacter* a cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos, os dados de 2014 demonstraram aumento deste percentual, que foi para 21% no ano<sup>57</sup>. Além do crescente papel do gênero em infecções graves, a resistência a carbapenêmicos em espécies de *Enterobacter* também tem sido fator preocupante nos hospitais brasileiros.

Além de importantes fatores de patogenicidade e do impacto clínico de uma infecção por cepas do gênero, a produção de enzimas ESBL pelas espécies de *Enterobacter cloacae*, associado ao fator transporte intestinal endógeno, caracterizam altos níveis de colonização intestinal por essas bactérias em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles com uso prévio de cefalosporinas.

#### **2.4.1 Surtos por *Enterobacter* sp.**

Frequentemente, espécies de *Enterobacter* têm sido associadas a importantes surtos no mundo todo.

Rocidio et al. reportaram, no período de 2013 a 2014, 21 casos de infecção em pacientes de unidades críticas associado a *Enterobacter cloacae* produtor de OXA-48 e CTX-M15. Este surto estava associado a dois clones distintos e foi o primeiro relato de surto associado à *Enterobacter* com produção de OXA-48 na Europa<sup>58</sup>.

No Nepal, Crook et al., em 2015, avaliaram dois surtos de infecções de corrente sanguínea por espécies de *Enterobacter* em unidade de cuidados à neonatos. Um total de 23 isolados de *Enterobacter* sp. produtores de NDM-1 foram recuperados de hemoculturas de 16 neonatos. Os surtos foram relacionados à contaminação em dispensadores de sabonete<sup>59</sup>.

Em Singapura, um surto de *Enterobacter* sp. produtor de NDM foi identificado em uma enfermaria de cuidados agudos. A investigação detectou transmissão cruzada possivelmente associada aos cuidados em saúde como fator determinante para disseminação monoclonal. Fatores como uso prévio de mais de três antimicrobianos e Escore de Charlson  $\geq 4$  estavam presentes em mais 75% dos casos<sup>60</sup>.

Na Itália, um estudo recente caracterizou a transmissão interespecie de plasmídeos mediadores de enzimas KPC-3. O paciente previamente colonizado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, identificada em vários espécimes clínicos, também apresentou em secreção de abcesso cepas de *Enterobacter aerogenes*, que, após identificação molecular, foi caracterizado como portador do mesmo plasmídeo. Isso reforça o alto poder de disseminação das carbapenemases, também interespecíes<sup>61</sup>.

Entre 2010 e 2011, o Departamento de Saúde do Norte de Dakota (USA) identificou um surto monoclonal com 20 casos de *Enterobacter* sp. (19 *E. cloacae* e 1 *E. aerogenes*) em um hospital de 583 leitos na cidade de Fargo. Todos os isolados eram produtores de KPC<sup>62</sup>.

Na Venezuela, foi publicado agora em 2016, o primeiro surto de infecção de corrente sanguínea em UTI neonatal associado à *Enterobacter ludwigii*. Foram três casos no total, e os isolados apresentavam coprodução de enzimas de resistência aos antimicrobianos<sup>63</sup>.

No Brasil, um surto relacionado à *Enterobacter gergoviae* resistente a carbapenêmicos foi reportado recentemente após a realização de culturas de vigilância em pacientes transplantados renais do Hospital de Clínicas de São Paulo. No total, foram identificados 26 pacientes com isolados de *Enterobacter gergoviae*, todos produtores de metalo-betalactamases do tipo IMP<sup>64</sup>.

Espécies de *Enterobacter* são bastante associados a infecções nosocomiais uma vez que podem sobreviver na pele, em superfícies secas bem como em fluídos contaminados,

ocasionando surtos relacionados à contaminação de dietas enterais, humidificadores e equipamentos de terapia respiratória entre outros. No entanto, vale ressaltar que a transmissão paciente-paciente ocorre devido a práticas inadequadas em controle de infecção, como por exemplo, a baixa adesão à higiene de mãos.

## **2.5 ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO FRENTE À RESISTÊNCIA MICROBIANA**

A crescente prevalência de infecções por bacilos gram-negativos multirresistentes no mundo, somado à falta de novos antimicrobianos disponíveis no mercado com atividade frente a estes microrganismos, levaram a retomada do uso de antimicrobianos como as polimixinas como opções de última linha para tratamento destas infecções<sup>65,66</sup>.

A grande preocupação no uso de polimixinas em monoterapia para infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos é o desenvolvimento de resistência. Além disso, o uso de polimixinas em monoterapia tem sido associado a maiores taxas de falha no tratamento em comparação a terapias combinadas<sup>67</sup>. Um artigo publicado por Lee et al., em 2009, avaliou 12 pacientes que apresentaram *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC em hemocultura, mesmo após três dias de tratamento com polimixina B isoladamente ou em combinação com tigeciclina. Curiosamente, três dos 12 pacientes que receberam polimixina B em monoterapia tiveram aumento significativo nos valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM). O mesmo não foi observado nos pacientes que receberam terapia em combinação. Os autores sugeriram que a terapia combinada teria evitado o desenvolvimento de resistência à polimixina B<sup>68</sup>.

Os benefícios da terapia combinada incluem: redução da terapia empírica inadequada, potenciais efeitos sinérgicos e a redução da emergência de resistência. Na maior revisão até o momento, que inclui dados de 889 pacientes com infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, a terapia de combinação com dois ou mais agentes ativos *in vitro* foi associada com menor mortalidade comparado ao tratamento com um único agente antimicrobiano ativo *in vitro* (27% versus 38%  $p < 0,001$ )<sup>69</sup>.

Um estudo retrospectivo que avaliou 55 casos de infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e produtora de KPC observou que o sucesso terapêutico da polimixina B era maior quando associado a um segundo antimicrobiano, no caso tigeciclina, se comparado a monoterapia (73% versus 14%)<sup>25</sup>.

Tuon et al. conduziram um estudo em ratos com avaliação *in vitro*, com objetivo de determinar eficácia de meropenem, tigeciclina e polimixina B num modelo de infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC. O ensaio *in vivo* e *in vitro* demonstrou que regimes combinados, exceto meropenem com tigeciclina, foram mais eficazes que a monoterapia para as cepas testadas<sup>70</sup>.

Cars et al., em um estudo *in vitro* utilizando quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de metalo-betalactamases (2 VIM e 2 NDM), observaram sinergismo na maior parte das combinações com colistina para a cepa produtora de VIM. A cepa produtora de NDM apresentou sinergismo apenas às combinações: fosfomicina com colistina; fosfomicina com meropenem e com colistina; e rifampicina com meropenem e com colistina<sup>16</sup>.

Arslan et al. avaliaram a atividade sinérgica *in vitro* de fosfomicina, meropenem, imipenem, colistina e tigeciclina frente a 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de OXA-48. Curiosamente, a combinação fosfomicina com colistina mostrou-se antagonista, o que não foi observado para outras combinações<sup>71</sup>.

Wen-Liang Yuc et al. avaliaram sinergismo entre imipenem e colistina por método TKC de um isolado de *Enterobacter cloacae* recuperado de material respiratório. No ensaio, imipenem, isoladamente ou em combinação com colistina, se mostrou ativo, porém somente quando utilizado a concentração quatro vezes maior que a CIM de imipenem. O mesmo não aconteceu com a colistina: mesmo utilizando concentrações maiores, o antimicrobiano apresentou apenas efeito bacteriostático<sup>72</sup>.

Apesar dos estudos *in vitro* sugerirem combinações que consideram, na maior parte das vezes, colistina/polimixina B e tigeciclina, há uma grande preocupação na prática clínica referente à toxicidade e à baixa difusão no trato urinário destes fármacos. Além disso, para infecções respiratórias está contraindicado tratamento com tigeciclina, considerando o risco de falha terapêutica. Paralelamente a algumas limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, está a importante seleção de resistência associada ao uso de colistina/polimixina B. Diante deste cenário de limitações terapêuticas importantes, alguns estudos têm proposto o uso de combinações de dois carbapenêmicos no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos<sup>73,74,75</sup>. O racional da combinação de dois carbapenêmicos (em especial ertapenem associado a outro carbapenêmico) seria a possibilidade do ertapenem ligar-se ao sítio ativo da enzima com maior afinidade, evitando a hidrólise do segundo carbapenêmico, sendo presumidamente mais efetivo. No entanto, a terapêutica baseada na teoria do “carbapenem suicida” ainda é bastante limitada, uma vez que não se tem estudos clínicos avaliando a efetividade da associação.

No que se refere à *Enterobacter* sp., as limitações são ainda maiores. Poucos são os estudos que avaliaram combinações de antimicrobianos para cepas resistentes aos carbapenêmicos. Em relação à terapia com dois carbapenêmicos, atualmente não existe nenhum estudo avaliando a combinação para o gênero.

## 2.6 ATIVIDADE BACTERICIDA E SINERGISMO

Não existe técnica padronizada para avaliar sinergismo entre antimicrobianos. Entretanto, três testes têm sido utilizados: Ensaio de Curvas Tempo-Morte Bacteriana ou *Time-Kill Curves* (TKC), Método de avaliação de sinergismo com fitas de Etest e Método de *Checkerboard*<sup>76,77</sup>. O Método de TKC e o Método de *Checkerboard* são os mais utilizados em testes de sinergismo. O Método de *Checkerboard* é um teste de microdiluição, onde é avaliada a CIM dos fármacos isoladamente e em combinação. Os cálculos para avaliar sinergismo são realizados a partir do índice de fração inibitória<sup>76,77,78</sup>. Para realização de ensaios TKC, são seguidas recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). O método avalia o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos que visam inibir o crescimento bacteriano<sup>79</sup>. A concentração do antimicrobiano e a morte da bactéria são avaliadas em distintos intervalos de tempo. A contagem média das colônias (UFC/mL) recuperadas com antimicrobiano, isoladamente e combinado, é comparada com o controle sem antimicrobiano<sup>78</sup>. O resultado final é expresso em log de UFC/mL. Define-se como “sinergismo” a diferença de  $\geq 2$  log na contagem de colônias, em 24 horas, da combinação testada frente ao agente isoladamente mais ativo<sup>78,80</sup>. A vantagem desta técnica é o fornecimento de dados sobre atividade bactericida da associação de antimicrobianos (definida como redução  $\geq 3$  log na contagem de colônias comparado ao inoculo inicial) e também a possibilidade de analisar dinamicamente a ação antimicrobiana e o tempo de interação, diferente do *Checkerboard*, que fornece dados apenas da concentração inibitória mínima da associação de antimicrobianos, e a análise de crescimento é examinada apenas uma vez, entre 16 a 24 horas.

Pournarasa et al. conseguiram demonstrar atividade sinérgica *in vitro* usando combinação de tigeciclina e colistina frente a cepas de enterobactérias produtoras de carbapenemases pelo método TKC, o que não foi observado com a combinação meropenem e colistina<sup>81</sup>. Em comparação, Pankey et al. em um ensaio de sinergismo com polimixina B, colistina e meropenem para isolados produtores de carbapenemases avaliaram a concordância entre os métodos de TKC e Etest. Este estudo avaliou 31 isolados de espécies de *Klebsiella*,

sendo o sinergismo para combinação de polimixina B e meropenem observado em 71% das cepas por TKC e 55% das cepas por Etest (concordância de 80.6%)<sup>82</sup>.

A combinação polimixina B e rifampicina também tem sido proposta por alguns autores<sup>83,84</sup>, porém a divergência de resultados entre os métodos testados pode ser observada em um estudo americano de Nova Orleans, que encontrou 100% de sinergismo para rifampicina e polimixina B no ensaio de TKC e 21% de sinergismo pelo método com fitas de Etest em isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemases<sup>85</sup>.

Nordmann et al. avaliaram a combinação de carbapenêmicos para 20 cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos produtoras de diferentes tipos de carbapenemases. A avaliação de sinergismo foi realizada por *Checkerboard* e TKC, sendo as combinações com imipenem mais outro carbapenêmico aquelas com maior sinergismo. Entretanto, a combinação meropenem + ertapenem não foi sinérgica para nenhuma cepa testada<sup>86</sup>.

Entre as técnicas *in vitro* propostas até o momento, destaca-se a *hollow-fiber infection model* (HFIM), ao qual tem sido utilizada para validação de resultados em testes de atividade bactericida e sinergismo. As técnicas com HFIM imitam as alterações de concentração de fármacos, chegando a resultados mais fidedignos de comportamento farmacocinético e farmacodinâmico<sup>87</sup>.

O TKC é um método demorado e trabalhoso, porém ainda é considerado o método *in vitro* com os melhores resultados para orientação de alternativas terapêuticas, uma vez que serve como ponto de partida para ensaios clínicos *in vivo*. É essencial que as concentrações dos antimicrobianos testados sejam definidas a fim de representar as concentrações séricas necessárias para inibir o crescimento do microrganismo no sítio da infecção.

### 3 MARCO TEÓRICO

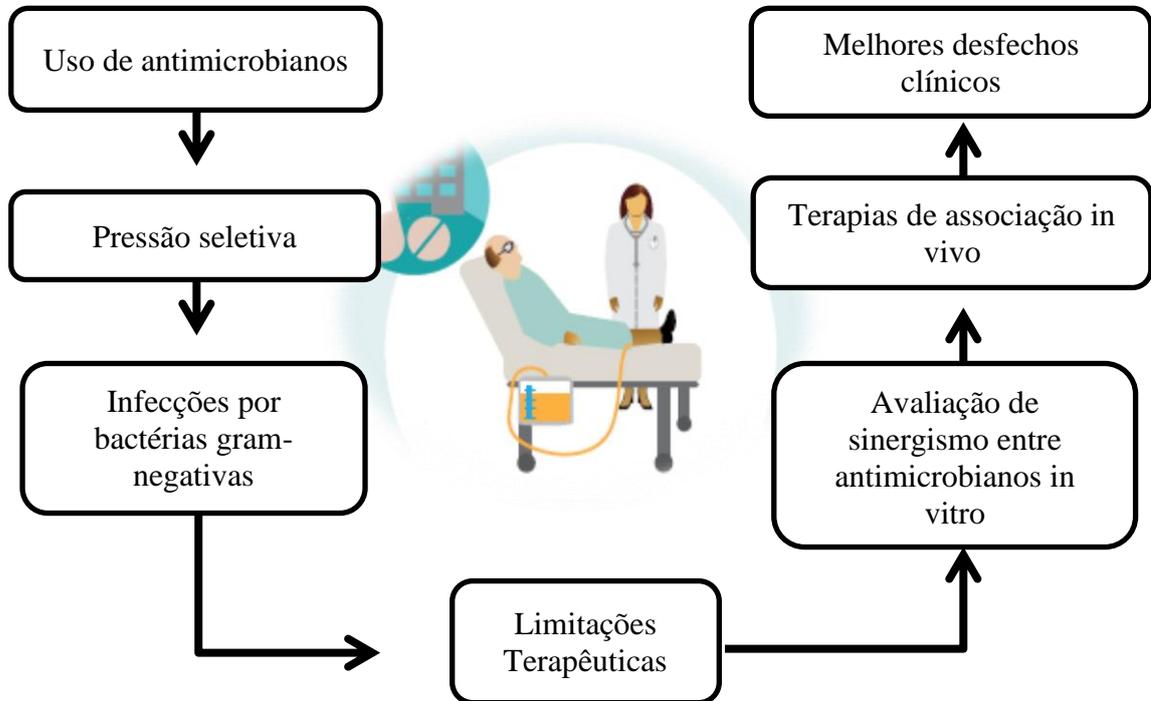


Figura 2. Explicação do Marco-Teórico.

Fonte: elaborado pela autora.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O crescente aumento da resistência bacteriana já é descrito hoje pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das três maiores ameaças à saúde humana. A preocupação é ainda maior quando se trata de bacilos gram-negativos multirresistentes, já que desde os anos 90 houve um acentuado declínio na pesquisa e desenvolvimentos de novos antimicrobianos contra estas bactérias.

Na tentativa de suprir a necessidade de novos fármacos, combinações de antimicrobianos têm sido cada vez mais propostas. Além disso, para algumas infecções específicas, a terapia combinada parece apresentar melhores desfechos clínicos.

Assim, um estudo que avalie possibilidade de sinergismo entre fármacos ativos contra *Enterobacter* sp. com resistência mediada ou não por carbapenemases é de grande relevância na tentativa de otimizar o tratamento frente a infecções graves causadas por esses microrganismos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de polimixina B isoladamente e em combinação com carbapenêmicos e tigeciclina, contra isolados de *Enterobacter* sp. resistente aos carbapenêmicos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a CIM para polimixina B, tigeciclina e meropenem para amostras do estudo;
- b) Validar o método de curva de tempo-morte para polimixina B isoladamente e em combinação com tigeciclina, meropenem e ertapenem;
- c) Avaliar atividade de polimixina B em combinação com meropenem contra diferentes isolados de *Enterobacter* sp. produtores de KPC, NDM e OXA-48-like e não produtor de carbapenemase;
- d) Avaliar a atividade de polimixina B em combinação com tigeciclina contra diferentes isolados de *Enterobacter* sp. produtores de KPC, NDM e OXA-48-like e não produtor de carbapenemase;
- e) Avaliar a atividade de meropenem e ertapenem contra isolados de diferentes clones de *Enterobacter* sp. produtores de KPC, NDM e OXA-48-like e não produtor de carbapenemase.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar;8(3):159–66.
2. Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S, Markou F, Tsakris A. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase and SHV-2a extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist*. 2008 Jan;13(4):221–6.
3. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May;289(1036):321–31.
4. Sidjabat HE, Kamolvit W, Wailan A, Paterson DL. Multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Microbiol Aust*. 2013 Mar;34(1):43–6.
5. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440–58.
6. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151–61.
7. Lee C, Lee J, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016 Jun;7: 1–30.
8. Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Papeolu MFI, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4793–9.

9. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1413–8.
10. Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE, Paterson DL, Doi Y. Activity of temocillin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2700–1.
11. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(7):943–50.
12. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenem as conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015 May;16(5):9654–92.
13. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5046–54.
14. Kazi M, Drego L, Nikam C, Ajbani K, Soman R, Shetty A, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a tertiary care laboratory in Mumbai. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Mar;34(3):467–72.
15. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011 Dec;19(12): 588–95.
16. Tangden T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerback P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Mar;58(3):1757–62.

17. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15–22.
18. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemases producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep; 20(9):821–30.
19. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jun;58(6):3566–7.
20. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD et al. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4453–6.
21. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends Mol Med*. 2012 May;18(5):263–72.
22. Laishram S, Anandan S, Devi BY., Elakkiya M, Priyanka B, Bhuvaneshwari T, et al. Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance. *J Chemother*. 2015 Oct 2: 1973947815Y0000000079.
23. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Dec;17(12):1798–803.
24. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan; 56(4):2108–13.

25. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Apr;65(6):1119–25.
26. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase- producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems?. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Aug;17(8):1135–41.
27. Michalopoulos A, Vartzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: A prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb; 16(2):184–6.
28. Sanders WE Jr, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol.* 1997 Apr;10(2):220–41.
29. Hormaeche E, Edwards PR. A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomencl.* 1960 Apr;10(2):71–4.
30. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, et al. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., Three New Subspecies of Clinical Importance. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3297–303.
31. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012 Jul;7(7):887–902.
32. Akbari M, Bakhshi B, Peerayeh SN. Particular Distribution of *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Urinary Tract Infection within Clonal Complexes. *Iran Biomed J.* 2016 Jan;20(1):49–55.
33. Davin-Regli A, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 2015 May;6:1–10.

34. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jan;59(2):165–74.
35. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb;63(4):659–67.
36. Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012 May;27(2):128–42.
37. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1791–8.
38. Kumarasamy KK, Toleman M, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep;10(9):597–602.
39. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(7):1597–1606.
40. Maherault AC, Nordmann P, Therby A, Pangon B. Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clin Infect Dis.* 2011 Dec;54(4):577–8.
41. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(8):2950–4.
42. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J. Clin. Microbiol.* 2001 Jan; 39(1):183–190.

43. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(9):2070–4.
44. Gooderham WJ, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Mar;33(2):279–294.
45. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* 2008 Oct; 4(10):1–11.
46. Mitrophanov AY, Groisman EA. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 2008 Oct;22: 2601–2611.
47. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014 Nov; 5:1–18.
48. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb;16(2):161–8.
49. Norgan AP, Freese JM, Tuin PM, Cunningham SA, Jeraldo PR, Patel R. Carbapenem- and Colistin-Resistant *Enterobacter cloacae* from Delta, Colorado, in 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 May;60(5):3141–4.
50. Reynolds R, Kidney A, Mushtaq S. Surprisingly high prevalence of colistin-resistance in *Enterobacter* spp. in the UK and Ireland. In: ECCMID2013. Berlin; 2013.
51. Walkty A, DeCorby M, Nichol K, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG. In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of gram-negative bacilli

obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4924–6.

52. Georghiou PR, Hamill RJ, Wright CE, Versalovic J, Koeuth TT, Lupski JR. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clin Infect Dis.* 1995 Jan; 20(1):84–94.
53. Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “killer bugs” are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol.* 2013 Feb;30(2):369–83.
54. Song EH, Park KH, Jang EY, Lee EJ, Chong YP, Cho OH, et al. Comparison of the clinical and microbiologic characteristics of patients with *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* bacteremia: a prospective observation study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Apr;66(4):436–40.
55. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jan; 34(1):1–14.
56. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Aug; 73(4):354–60.
57. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12. Brasília: Anvisa; 2015 Jan. Disponível em:  
<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>.

58. Fernández J, Montero I, Martínez Ó, Fleites A, Poirel L, Nordmann P, Rodicio MR. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Oct;46(4):469–74.
59. Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, et al. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan; 70(4):1008–15.
60. Ho HJ, Toh CY, Ang B, Krishnan P, Lin RT, La MV, et al. Outbreak of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Enterobacter cloacae* in an acute care hospital general ward in Singapore. *Am J Infect Control*. 2016 Feb; 44(2):177–82.
61. Venditti C, Villa L, Capone A, Fortini D, D'Arezzo S, Nisii C, et al. Isolation of KPC 3-producing *Enterobacter aerogenes* in a patient colonized by MDR *Klebsiella pneumoniae*. *New Microbiol*. 2016 Jun; 39(3): 1–12.
62. Kiedrowski LM, Guerrero DM, Perez F, Viau RA, Rojas LJ, Mojica MF, et al. Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Isolates Producing KPC-3, North Dakota, USA. *Emerg Infect Dis*. 2014 Sep; 20(9):1583–1585.
63. Flores-Carrero A, Labrador I, Paniz-Mondolfi A, Peaper DR, Towle D, Araque M. Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter ludwigii* co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016 Oct 7;7:114–118.
64. Freire MP, Garcia DO, Cury AP, Spadão F, Di Gioia TS, Francisco GR, et al. Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* among kidney transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2016 May;71:2577–85.
65. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jan;18(1):18–29.

66. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005 May; 40(9):1333–41.
67. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Dec; 11:1–9.
68. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1611–2.
69. Tzouvelekis LS1, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):862–72.
70. Toledo PVM, Aranha Junior AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP, Tuon FF. Activity of Antimicrobial Combinations against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Rat Model and Time-Kill Assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):4301–4.
71. Evren E, Azap OK, Çolakoğlu Ş, Arslan H. In vitro activity of fosfomicin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):335–8.
72. Lin KH, Chuang YC, Lee SH, Yu WL. In vitro synergistic antimicrobial effect of imipenem and colistin against an isolate of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Aug;43(4):317–22.
73. Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaiskos I. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2388–90.

74. Ceccarelli G, Falcone M, Giordano A, Mezzatesta ML, Caio C, Stefani S, Venditti M. Successful Ertapenem-Doripenem Combination Treatment of Bacteremic Ventilator-Associated Pneumonia Due to Colistin-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jun;57(6):2900–1.
75. Bulik CC, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):3002–4.
76. Mitsugui CS, Tognim MCB, Carrara- Marrone FE, Garcia LB. Efeito antimicrobiano *in vitro* da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Cienc Cuid Saúde*. 2008 May;7(1):76–81.
77. Pankey GA, Achcraft DS. In vitro synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2959–64.
78. White R, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detection synergism: Time-Kill, Checkerboard and Etest. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Aug;40(8):1914–8.
79. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. v. 19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
80. 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 Dec;30(6):537–40.
81. Pournarasa S, Vrionib G, Neoua E, Dendrinis J, Dimitroulia E, Poulou A. 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 Mar; 37(3): 244–7.

82. Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov; 77(3):220–6.
83. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother*. 2005 May;56(1):128–32.
84. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct;48(10):3558–62.
85. Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Aug; 70(5):561–4.
86. Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. In vitro evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Sep;71(1):156–61.
87. Cadwell JJS. The Hollow Fiber Infection Model for Antimicrobial Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. *Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013 Jan; S1:1–5.
88. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009 Jan; 48(1): 1-12.
89. Center Diseases Control. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs [Internet]. Atlanta: Department of Health and Human Services; 2014. Disponible em: <http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html>.

## 7 ARTIGOS

### 7.1 ARTIGO 1

Submetido à: *International Journal of Antimicrobial Agents*

Activity of polymyxin B combined with tigecycline and meropenem against to carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolates

Running title: Polymyxin B plus tigecycline or meropenem for *Enterobacter cloacae*.

Paola Hoff Alves<sup>1,2,3</sup>, Andreza Francisco Martins<sup>1,4</sup>, Afonso Luis Barth<sup>\*1,2</sup>

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

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

3 Serviço de Controle de Infecção, Hospital São Lucas da Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil

4 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

\*Corresponding author at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90.035-903, Brazil. Phone +55 51 3359 8607

E-mail address: albarth@hcpa.edu.br

## ABSTRACT

Due to the increase in microbial resistance, antimicrobial combinations are being increasingly used to improve the therapeutic response. The objective of this study was to compare the activity of polymyxin B alone and combined with tigecycline and meropenem against carbapenem-resistant *Enterobacter* sp. isolates. Four isolates were selected, which three were carbapenemase-producing (KPC, NDM, OXA-48-like) and a non-carbapenemase-producing (NCP). The evaluation of synergistic antimicrobial activity was performed by time-kill assay with the following concentrations of each antimicrobial: tigecycline 1mg/L and meropenem 1mg/L, that it is CLSI breakpoint. For polymyxin B, different concentrations were used according to the susceptibility profile of the isolate: for the sensitive isolates, it was used 0.5x; 1x and 2x the MIC of the isolate; for the resistant isolate, it was used 0.5x; 1x and 2x the CLSI breakpoint (2 mg/L). The combination with reduction  $\geq 2$  logs of the inoculum in 24 hours compared to the most active alone antimicrobial was considered synergistic. Combinations of polymyxin B at different concentrations (0.5; 1 and 2 mg/L) with meropenem showed synergistic activity for the NDM-producing isolate (MIC polymyxin B 1 mg/L, MIC meropenem 8 mg/L). Combinations of polymyxin B with tigecycline were synergistic only at the concentration of polymyxin B of 0.125 mg/L for the OXA-48-like-producing isolate (MIC polymyxin B 0.25 mg/L, MIC tigecycline 2 mg/L) and at the concentration of 1 mg/L for the NDM-producing isolate. For the NCP isolate (MIC polymyxin B 0.5 mg/L; MIC tigecycline 4 mg/L; MIC meropenem 4 mg/L), only the triple combination with polymyxin B (1 mg/L), tigecycline and meropenem showed synergistic activity. For the KPC-producing isolate that it is polymyxin B resistant, none of the combinations tested showed synergies. This situation is very worrisome due to high prevalence of infections by KPC producers in the Brazilian hospitals, associate with the increasing rates of polymyxins resistance.

**Keywords:** Synergism; carbapenems; polymyxin; tigecycline; Time-Kill.

## 1 INTRODUCTION

The increasing prevalence of infections due to enterobacteriaceae resistant to carbapenems (CRE) in addition to the lack of new antimicrobials with activity against these

microorganisms led to the increased use of last resort antimicrobials such as polymyxins [1,2].

The major concern related to the use of polymyxins in monotherapy for infections due to CRE is the development of resistance. Moreover, due to the pharmacokinetic and pharmacodynamics limitations of the polymyxins, it is believed that these drugs would be more effective against serious infections by CRE, as part of a combined therapy. The benefits of combined therapy include: reduction of inadequate empiric therapy, potential synergistic effects and reduction of the emergence of resistance [3].

Considering the fact that carbapenemases present different profiles of hydrolysis to carbapenem, in this study we have compared the polymyxin B activity alone and combined with tigecycline and meropenem against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolates.

## **2 METHODS**

### ***2.1 Isolates***

Four isolates of *Enterobacter cloacae* (from 3 different hospitals) were selected according to their susceptibility profile and resistance mechanism: all were ertapenem-resistant, one was a NDM-producing, one was an OXA-48-like-producing, one was a KPC-producing (which will be referred as KPC-R) and one was a non-carbapenemase-producing (NCP). The isolates were characterized using standard or automated biochemical methods and multiplex high resolution melting (HRM), real-time PCR to detect the carbapenemase genes [4].

### ***2.2 Minimum Inhibitory Concentration***

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of polymyxin B, meropenem and tigecycline were determined by the microdilution broth method [5]. Breakpoints for polymyxin B (susceptible  $\leq 2$ mg/L and resistant  $\geq 4$  mg/L), tigecycline (susceptible  $\leq 1$ mg/L and resistant  $\geq 4$  mg/L) and meropenem (susceptible  $\leq 1$ mg/L and resistant  $\geq 4$  mg/L) have followed the recommendations of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [5].

### ***2.3 Time Kill Curves (TKC)***

The antimicrobial polymyxin B alone and combined (polymyxin B + meropenem, polymyxin B + tigecycline and polymyxin B + meropenem + tigecycline) were used at concentrations of 0.5x, 1x and 2x MIC for the isolates that were susceptible to the antimicrobial; the breakpoint concentration established by the CLSI (2mg/L) was used for the resistant isolates. The other antimicrobials were used at concentrations according to CLSI breakpoints as follows: tigecycline 1mg/L and meropenem 1mg/L.

A concentration  $10^6$  CFU/mL was used as initial inoculum for TKC assay, the isolates were inoculated in 10 mL of Mueller-Hinton cation adjusted broth. Aliquots were removed at times 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after the addition of the antimicrobials, serially diluted and plated on blood agar for colony count.

Synergy was defined as the reduction of  $\geq 2 \log_{10}$  of CFU/mL by the combination of antimicrobials when compared to the most active antimicrobial alone at 24h. Antagonism was defined as an increase in colony counts of  $>2 \log_{10}$  by the combination compared to the most active agent alone at 24h. Bactericidal activity was defined as  $\geq 3 \log_{10}$  reductions from the total CFU/mL related to the original inoculum [5].

### 3 RESULTS

The MICs indicated a low level of resistance of isolates to meropenem and tigecycline. One isolate (KPC-producing *Enterobacter cloacae*) was resistant to polymyxin B (MIC 16 mg/L) and the others were susceptible (Table 1).

Polymyxin B presented bactericidal activity for the NDM-producing isolate only at concentrations of 1x and 2x MIC. Meropenem and tigecycline presented no bactericidal activity for the isolates.

The combination of polymyxin B plus tigecycline was synergic for the NDM-producing and the OXA-48-producing isolates at 1x and 0.5x MIC at concentrations of polymyxin B, respectively. However, only the NDM-producing isolate presented non-detectable growth in 24 hours (at a concentration of 1x MIC of polymyxin B plus tigecycline). This combination has a synergic effect also at the concentration of 0.5 x MIC of polymyxin to the OXA-48-like-producing isolate. It has to be considered, that at the concentration of 1x MIC polymyxin B we observed a synergic effect in 12 hours of incubation, but not at 24 hours (data not shown).

The combination of polymyxin B (at any concentration) plus meropenem was synergic for the NDM-producing isolate. Moreover, the combination of 2x MIC of polymyxin B plus

meropenem reduced the inoculum to a no detectable growth in 2h which remained up to 24h of incubation (Figure 1).

None of the combinations evaluated in this study presented synergies against the KPC-producing isolate which was the only *E. cloacae* isolate resistant to polymyxin alone.

For the NCP isolate only the triple combination: polymyxin B (1x MIC) plus tigecycline plus meropenem was synergic, despite the fact that this combination was not able to reduce the bacterial inoculum to undetectable levels.

#### 4 DISCUSSION

Infections due to carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) and, more recently, the polymyxin B resistant, are cause of great concern due to the reduced therapeutic options. Moreover, some studies have reported the fast development of hetero-resistance when polymyxin B is used in monotherapy to treat infections due to gram-negative rods [6-7]. In fact, there are reports of significant increase in minimum inhibitory concentrations (0.75 mg/L to 1,024 mg/L) after only 5 days of treatment with polymyxin B in monotherapy for a bloodstream infection due to CRE [8]. According to our results, polymyxin B alone presented low bactericidal activity even at concentrations above the breakpoint of susceptibility (2 mg/L). In fact, polymyxin B alone presented bactericidal effect against only 1 of 3 isolates susceptible to polymyxin B. Noteworthy, polymyxin B alone was able to reduce considerably the initial inoculum of the OXA-48-producing isolate (susceptible to polymyxin B) at increased concentrations (1x and 2x MIC) despite the fact that it did not reach bactericidal effect. This finding could be explained by the PK/PD antimicrobial of polymyxin B ( $f$  AUC/MIC) [9] which indicates that increased doses of polymyxin B is related to best clinical outcomes as reported by Falagas et al., 2006 [7] and Elias et al., 2010 [10].

Noteworthy, the NCP and KPC-producing isolates displayed very similar time kill curves regardless the fact that these isolates presented considerable different MIC for polymyxin B. This low polymyxin B activity against the NCP isolate seem to be related to hetero-resistant subpopulation once there was inoculum reduction in 2h but the isolate presented exponential growth along 24 hours. Such resistance profiles are of great concern as these resistant mutants seem to have a stable phenotype which does not revert to the susceptible phenotype in the absence of antimicrobial exposition [11]. One could speculate that this may also occurs in vivo and impair the treatment of infections due to polymyxin susceptible isolates.

Meropenem plus polymyxin B was the most promising combination: it presented bactericidal activity for the OXA-48-like-producing isolate and was synergic even in sub-inhibitory concentration of polymyxin B to the NDM-producing isolate. Additionally, the meropenem plus 2x MIC of polymyxin B combination, when compared to the monotherapy, was able to reduce the inoculum to a no detectable growth (from 2h to 24h) which indicates that this combination would avoid regrowth. Similar results were observed by Yang et al. [12] using the combination of imipenem plus colistin against *Enterobacter cloacae* in a time kill assay. These results reinforce the fact that it is more difficult for the isolate to select resistant population when it is exposed to the combination of antibiotics.

The results of combinations with tigecycline were quite diverse. The NCP and KPC-R isolates did not respond to combinations of polymyxin B plus meropenem. In contrast, the polymyxin B plus tigecycline combination showed synergistic activity for the OXA-48 isolate only in polymyxin B sub-MIC concentration (0.25 mg/L). This fact may be associated to high bacterial growth after exposure to polymyxin B sub-MIC concentration alone in relation to the growth of the combination of antimicrobials which facilitate the characterization of synergism.

Another important point regarding in vitro assays of tigecycline combinations is related to the antimicrobial concentrations used in the tests. Many studies used, in the time kill assays, antimicrobial concentrations much higher those used in clinical practice. For instance, Cai et al [13] have found synergies for the association of polymyxin B plus tigecycline against *Enterobacter* species with reduced susceptibility to tigecycline but the study used tigecycline and polymyxin B at concentrations 16 times higher than our study.

The triple combination (polymyxin B plus tigecycline plus meropenem) was not effective against the carbapenemase producing isolates and presented synergy only for the NCP isolate. However, it is possible to speculate that the synergy of the triple combination for the NCP isolate was independent of polymyxin B as the combination of polymyxin B plus meropenem and polymyxin B plus tigecycline did not present synergy. Therefore, we could conclude that the association of tigecycline with meropenem could be responsible for the synergies of the triple combination (data not evaluated in our study).

Some important points can be highlighted as limitation of work: (a) the small number of isolates evaluated, (b) the lack of full characterization of the carbapenem-resistance mechanism of the NCP isolate and (c) our work has not assessed the MIC after the regrowth phenomenon.

Studies which assess the *in vitro* synergy are important since they represent the basis for further *in vivo* studies. To our knowledge, this is the first study to assess antimicrobial combinations to *Enterobacter* KPC, NDM and OXA-48-like-producing isolates. Moreover, our findings point out to the importance of identifying the carbapenemases type to choose the therapeutic combination to CRE infections. In our work there was a diversity of results (synergism and bactericidal activity) for different isolates which could be related to the carbapenemase type. However, it has to be considered that the inefficacy of combined therapies may also be related to high levels of polymyxin B resistance.

In our study we found some antimicrobial combinations which were very effective *in vitro* against particular isolates using antibiotics in concentrations which could be reached using usual dose regimes. Further *in vivo* studies are warranted to validate to clinical use of these combinations.

## REFERENCES

- [1] Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:159-66.
- [2] Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* 2016; 13:895.
- [3] Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2108-13.
- [4] Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:906–9.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth Information supplement M100-S24. Wayne, PA,USA, 2014.
- [6] Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11:1333-53.

- [7] Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:194-9.
- [8] Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:593-9.
- [9] Bergen PJ, Bulitta JB, Forrest A, Tsuji BT, Li J, Nation RL. Pharmacokinetic/pharmacodynamic investigation of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* using an in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 : 3783-9.
- [10] Elias LS, Konzen D, Krebs JM, Zavascki AP. The impact of polymyxin B dosage on in-hospital mortality of patients treated with this antibiotic. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2231-7.
- [11] Lim TP, Cai Y, Hong Y, Chan EC, Suranthran S, et al. In vitro pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:2515-24.
- [12] Yang H, Chen G, Hu L, Liu Y, Cheng J, et al. Enhanced efficacy of imipenem-colistin combination therapy against multiple-drug-resistant *Enterobacter cloacae*: in vitro activity and a *Galleria mellonella* model. *J Microbiol Immunol Infect* 2016;29 pii: S1684-1182(16)00034-7.
- [13] Cai Y, Lim TP, Teo J, Sasikala S, Lee W, et al. In Vitro Activity of Polymyxin B in Combination with Various Antibiotics against Extensively Drug-Resistant *Enterobacter cloacae* with Decreased Susceptibility to Polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5238-5246.

**Table 1.** Evaluation of bactericidal activity in 24h and synergism by Time Kill assay of carbapenemase producing and non-producing *Enterobacter* sp. Isolates

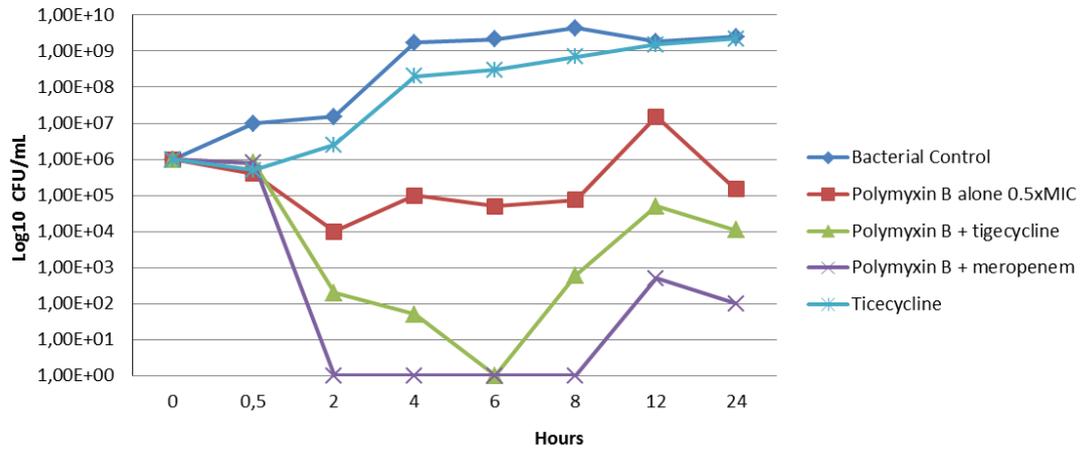
Antimicrobial/Combination	<i>E. cloacae</i> KPC-R <sup>a</sup>	<i>E. cloacae</i> NDM <sup>b</sup>	<i>E. cloacae</i> OXA-48-like <sup>d</sup>	<i>E. cloacae</i> NCP <sup>c</sup>
Polymyxin B – MIC (mg/L)	16	1	0.25	0.5
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
0,5x MIC	+3.4	-0.8	-0.3	+3.7
1x MIC	+1.7	-6,0*	-2.6	+0.7
2x MIC	+1.7	-6,0*	-2.4	+0.7
Tigecycline – MIC (mg/L)	4	8	2	4
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
Concentration 1mg/L (breakpoint)	-0.3	+3,3	+2.7	+0.7
Polymyxin B + Tigecycline				
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
0,5x MIC	-1.0	-1,1	-2.5	0
1x MIC	-1.7	-9,3*	+0.2	-1.3
2x MIC	-1.0	+3,7	+1.4	-0.5
Meropenem – MIC (mg/L)	4	8	8	4
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
Concentration 1mg/L (breakpoint)	+2.8	+3.7	+2.7	+0.7
Polymyxin B + Meropenem				
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
0,5x MIC	-0.4	-3.1*	-0.9	0
1x MIC	0	-9.3*	+0.1	0
2x MIC	0	-9.3*	-1.8*	0
Polymyxin B + Tigecycline + Meropenem				
<i>Mean Change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>				
1x MIC	-1.7	+6.7	+1.7	-4.0*

\*bactericidal effect

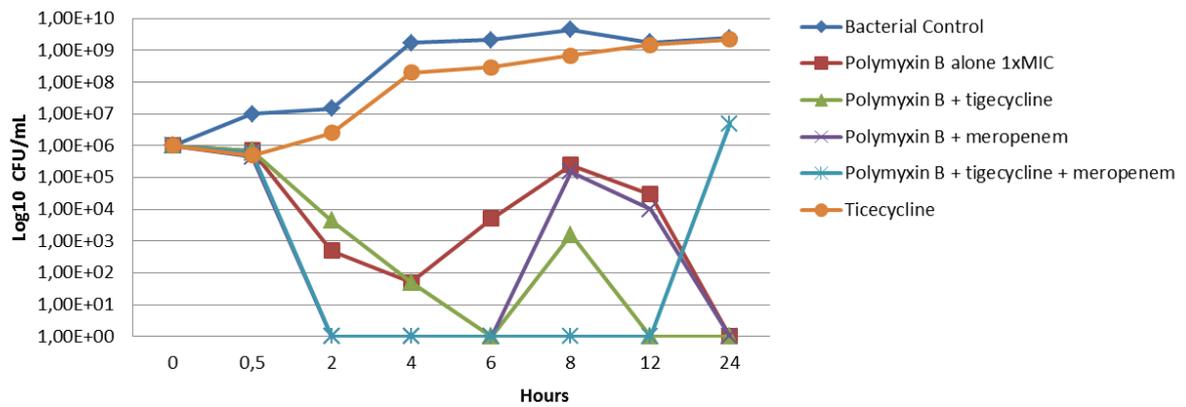
Synergism is represented by gray color.

- a.** Polymyxin B resistance isolate, it was used concentration according to the CLSI breakpoint: (1x) 2mg/L, (0.5x) 1 mg/L e (2x) 4 mg/L
- b.** Polymyxin B sensitive isolate, it was used concentration according to the minimum inhibitory concentration: (1x) 1 mg/L, (0.5x) 0.5 mg/L e (2x) 2 mg/L
- c.** Polymyxin B sensitive isolate, it was used concentration according to the minimum inhibitory concentration: (1x) 0.5 mg/L, (0.5x) 0.25 mg/L e (2x) 1 mg/L
- d.** Polymyxin B sensitive isolate, it was used concentration according to the minimum inhibitory concentration: (1x) 0.25 mg/L, (0.5x) 0.125 mg/L e (2x) 0.5 mg/L

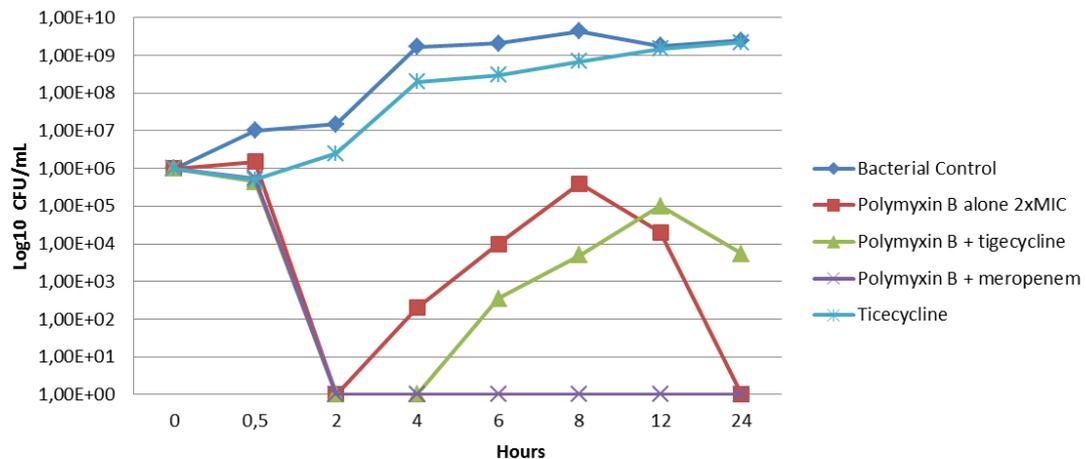
### Polymyxin B (0.5mg/L) alone and combinations



### Polymyxin B (1 mg/L) alone and combinations



### Polymyxin B (2 mg/L) alone and combinations



**Figure 1:** Time-kill performed in cation-adjusted Mueller-Hinton broth at 0.5x, 1x and 2x MIC of polymyxin B to *Enterobacter cloacae* NDM-producing. The antibiotic concentrations of tigecycline and meropenem were 1mg/L.

## 7.2 ARTIGO 2

Research letter submitted to: Brazilian Journal of Microbiology

Evaluation of synergism of double and triple combinations using carbapenems for *Enterobacter* sp. harbouring different carbapenemases.

Paola Hoff Alves<sup>1,2,3</sup>, Andreza Francisco Martins<sup>1,4</sup>, Afonso Luis Barth\*<sup>1,2</sup>

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

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

3 Serviço de Controle de Infecção, Hospital São Lucas da Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil

4 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

\*Corresponding author at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90.035-903, Brazil. Phone +55 51 3359 8607

E-mail address: albarth@hcpa.edu.br

Data of the last SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* in Latin American hospitals placed the genus *Enterobacter* sp. as the fifth most common cause of nosocomial infections and Brazil is the country with the highest number of *Enterobacter* sp isolates. The rates of resistance to carbapenems in this genus are around 8% according to the study<sup>1</sup>. Besides the resistance to carbapenems in enterobacteriaceae, the emergency of resistance to polymyxins (colistin and polymyxin B) has been a great concern in health institutions, since these antimicrobials are used as the last resort for treatment of infections of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE)<sup>2</sup>. In this scenario, some experimental studies have suggested the use of combination of two carbapenems to treat infections due to carbapenemase-producer isolates. The rationale of the combination of two carbapenems (specially ertapenem associated to another carbapenem) would be the possibility of the ertapenem (“suicidal carbapenem”) to bind to the active site of the carbapenemase with high affinity, allowing the second carbapenem to be more effective<sup>3,4</sup>.

Here, we evaluated the synergistic effect by *time kill curves* assay of the combination of meropenem plus ertapenem against three carbapenem-resistant isolates: KPC-producing, NDM-producing, OXA-48-producing *Enterobacter* sp. and one non-carbapenemase-producing (NCP). We also tested polymyxin B or tigecycline with the carbapenems in triple combinations.

For the *time kill* assay it was used initial inoculum of  $10^6$  CFU/mL and antimicrobial concentrations related to the breakpoint of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>5</sup> (meropenem 1mg/L, ertapenem 0.5 mg/L and tigecycline 1 mg/L). Combinations with polymyxin B used concentrations of 1x MIC for susceptible isolates (NDM, OXA-48-like and NCP) and 2 mg/L (breakpoint) for resistant isolates (KPC). Aliquots were removed at times 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours in serial dilutions and plated on to blood agar to count the colonies.

The combination of meropenem plus ertapenem presented no synergism for the isolates tested (Table 1). The association of polymyxin B with the double-carbapenems (triple combination) also did not present synergism. However, the association of tigecycline with the double-carbapenems was synergic against OXA-48-like producing isolate.

Poirel et al.<sup>6</sup> have recently reported an in vitro evaluation of the association of two carbapenems against KPC, NDM and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and found no synergism for the combination of meropenem plus ertapenem for the isolates tested. The authors have found synergism of the other combinations, particularly those in which imipenem was present and for KPC and OXA-48-producing isolates. None of the combinations

presented synergy for the NDM-producing isolates. Conversely, Pina-Vaz et al.<sup>7</sup> found that the combination of ertapenem plus imipenem showed synergic activity against KPC, VIM and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*.

In conclusion, as Poirel et al.<sup>7</sup>, we did not find synergy of the combination of meropenem plus ertapenem. Therefore it is possible to consider that the “suicidal ertapenem” therapy is not effective against all bacteria but it is dependent of the isolate (and species). In fact, among the carbapenems, combinations with imipenem seem to present the best activity against carbapenemase-producing isolates, especially for the genus *Enterobacter*. The therapy based on the theory of “suicidal carbapenem” has to be considered with caution and only after an in vitro evaluation of the carbapenem combination.

## REFERENCES

- 1 Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;**73**:354-60.
- 2 Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;**20**:862-72.
- 3 Wiskirchen DE, Crandon JL, Nicolau DP. Impact of various conditions on the efficacy of dual carbapenem therapy against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;**41**:582-5.
- 4 Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of humanized carbapenem exposures against New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-producing *enterobacteriaceae* in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;**57**:3936-40.
- 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performace standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth Information supplement M100-S24. Wayne, PA,USA; 2014.

6 Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. In vitro evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2016;**71**:156-61.

7 Pina-Vaz C, Silva AP, Faria-Ramos I, Teixeira-Santos R, Moura D, Vieira TF, et al. A Flow Cytometric and Computational Approaches to Carbapenems Affinity to the Different Types of Carbapenemases. Front Microbiol. 2016;**7**:1259

**Table 1:** Evaluation of bactericidal activity in 24h and synergism by Time Kill assay of carbapenemase producing and non-producing *Enterobacter* sp. isolates

Antimicrobial/ Combination	<i>E.cloacae</i> KPC	<i>E.cloacae</i> NDM	<i>E.cloacae</i> OXA-48- <i>like</i>	<i>E.cloacae</i> NCP
	<i>Mean change (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>			
Meropenem+Ertapenem	+0.04	1.38	1.00	0
Polymyxin + Meropenem+Ertapenem	1.00	+1.70	+1.98	0
Tigecycline + Meropenem+Ertapenem	+0.11	0.03	3.75	0.48

Synergism is represented by gray color.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta dos antimicrobianos foi um marco na medicina moderna, revolucionando a assistência médica do diagnóstico ao tratamento. No entanto, paralelamente ao imenso benefício do uso adequado dos antimicrobianos, estão os malefícios do uso inadequado, onde diferentemente de outras classes de medicamentos, as consequências do uso inadequado atingem não só os expostos, mas também os não expostos e eles<sup>88</sup>. O mau uso dos antimicrobianos tem contribuído para o crescente aumento da resistência bacteriana, que já se tornou hoje uma das ameaças mais graves para a saúde pública. De acordo com o *Centers for Diseases Control and Prevent* a estimativa é que mais de dois milhões de pessoas estejam infectados com bactérias resistentes a antimicrobianos, resultando em 23.000 mortes por ano<sup>89</sup>.

Diante deste cenário desesperador e da falta de novos antimicrobianos para tratamento de infecções graves por bactérias multirresistentes, as terapias de combinação vem sendo propostas com resultados promissores quando comparados a monoterapia<sup>69</sup>.

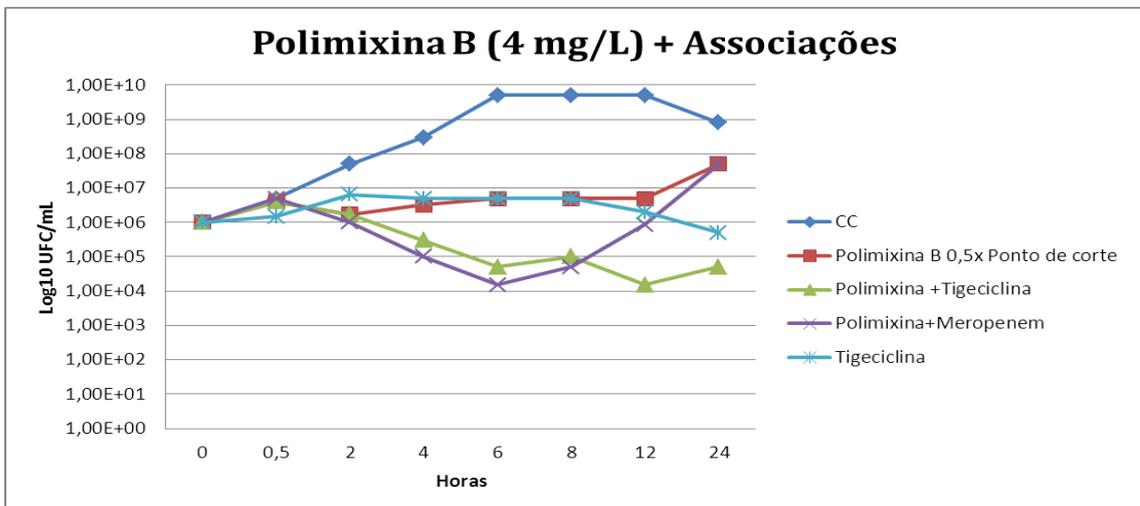
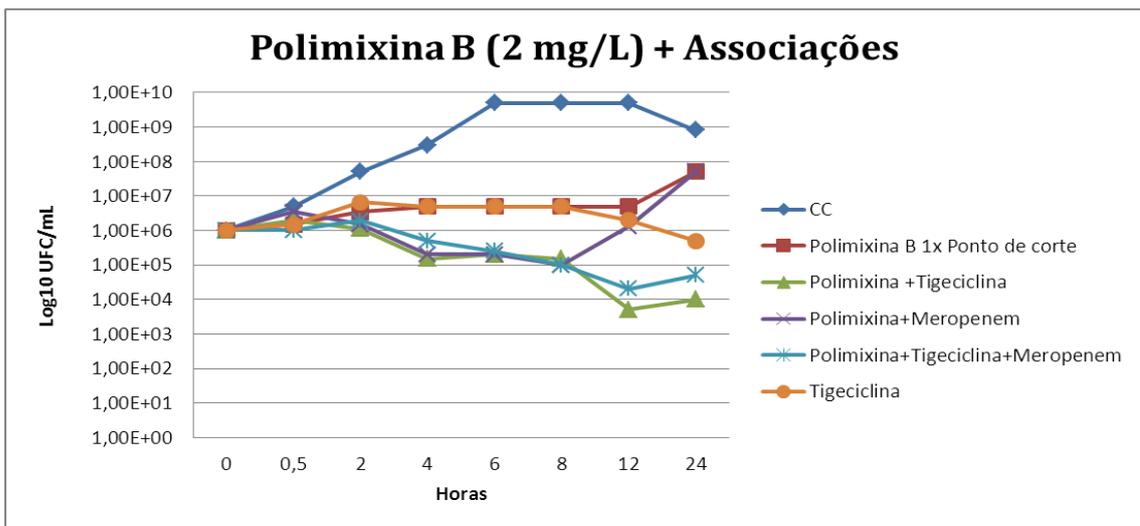
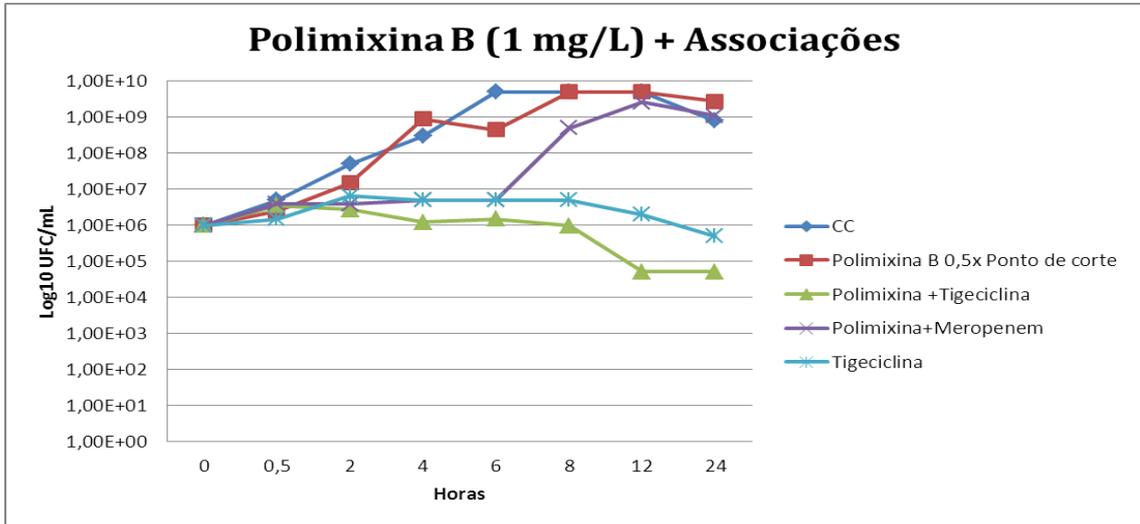
No entanto, os desafios do tratamento não se limitam ao perfil de sensibilidade da bactéria ao antimicrobiano, e neste contexto emerge a importância das técnicas de identificação molecular como aliada à escolha da melhor antibioticoterapia.

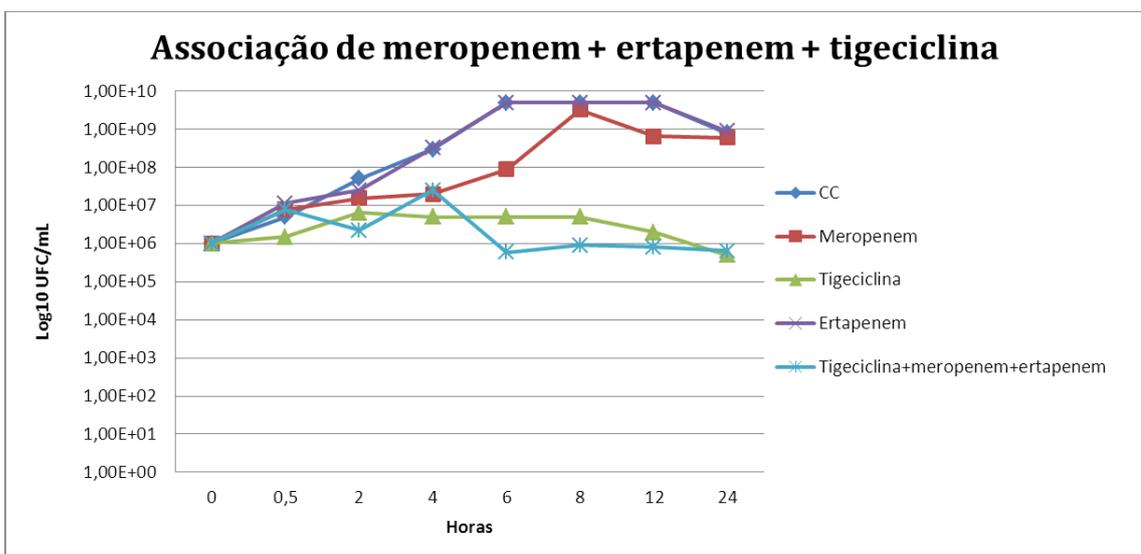
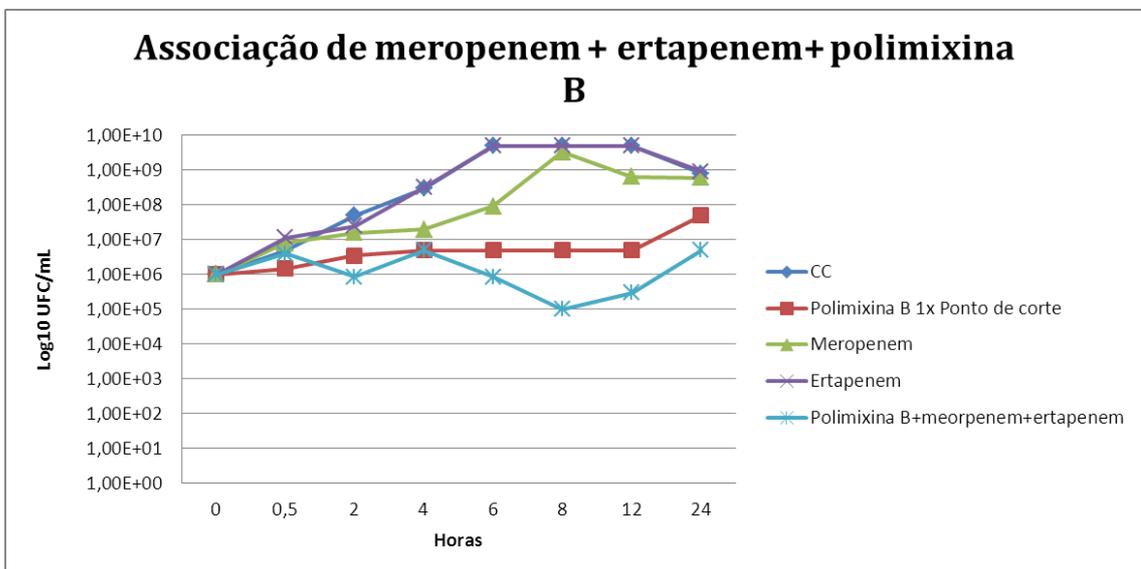
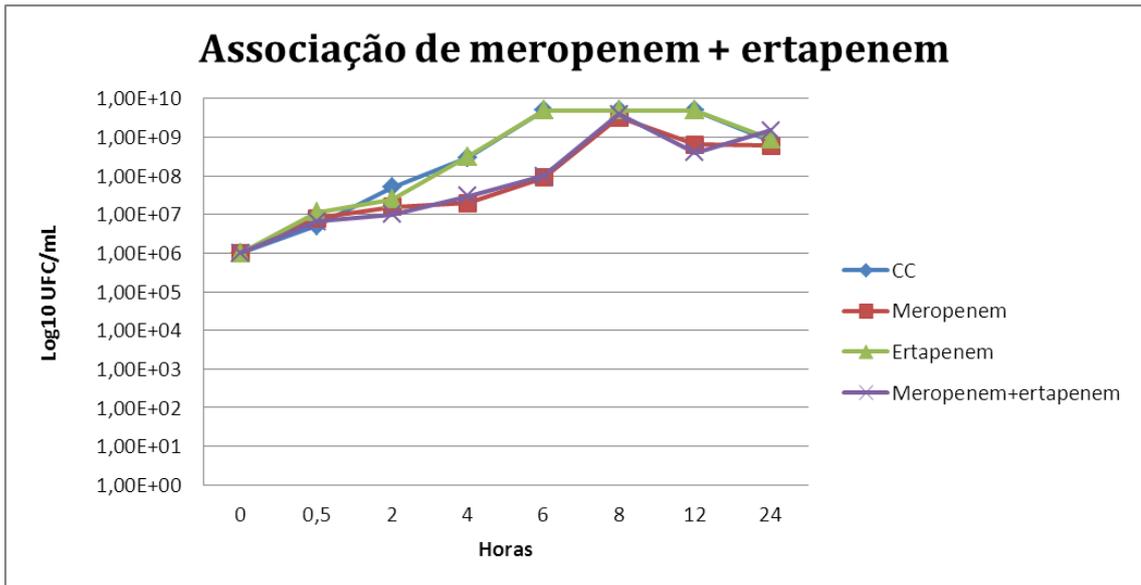
Ao avaliar combinações de antimicrobianos a isolados com mesmo perfil de resistência, mas com diferentes mecanismos, nós observamos distintas respostas de inibição bacteriana, sugerindo que a identificação do mecanismo de resistência deve ser levada em consideração no momento da escolha da terapia antimicrobiana. Paralelamente, torna-se evidente a necessidade de terapias cada vez mais individualizadas, onde testes *in vitro* de sinergismo também poderiam ser apoio na escolha terapêutica aplicados de maneira individual, considerando as particularidades de cada isolado.

A combinação polimixina B associada à meropenem foi a combinação mais promissora, apresentando sinergismo nas três concentrações de polimixina B testadas para o isolado produtor de NDM, podendo ser o mecanismo provável preditor de sinergismo.

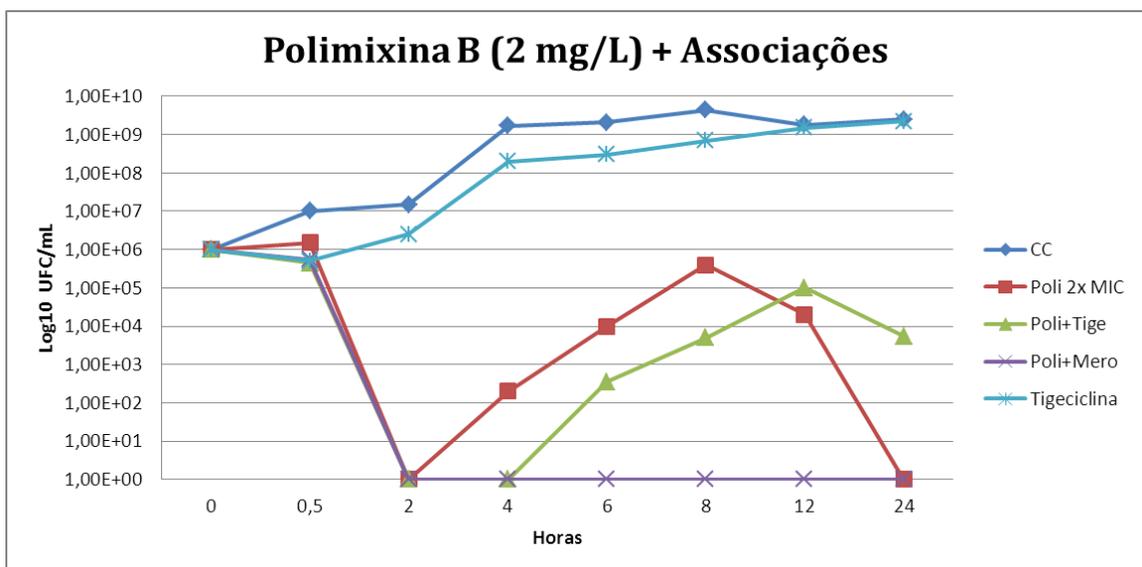
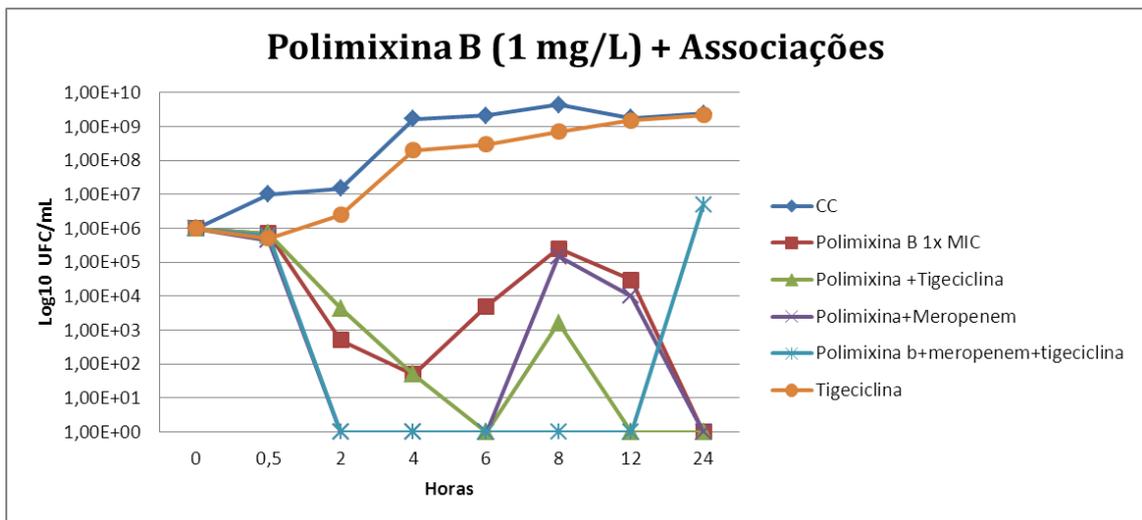
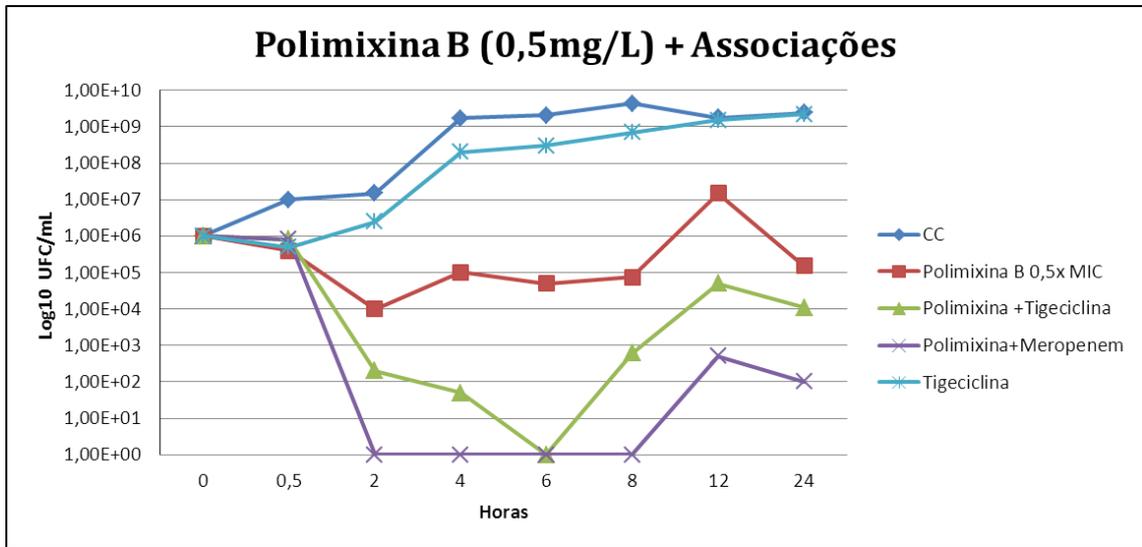
O número pequeno de amostras testadas limita a validade externa dos resultados aqui encontrados, no entanto estudos *in vitro* como este, são de extrema relevância científica uma vez que servem como base para futuros estudos *in vivo*.

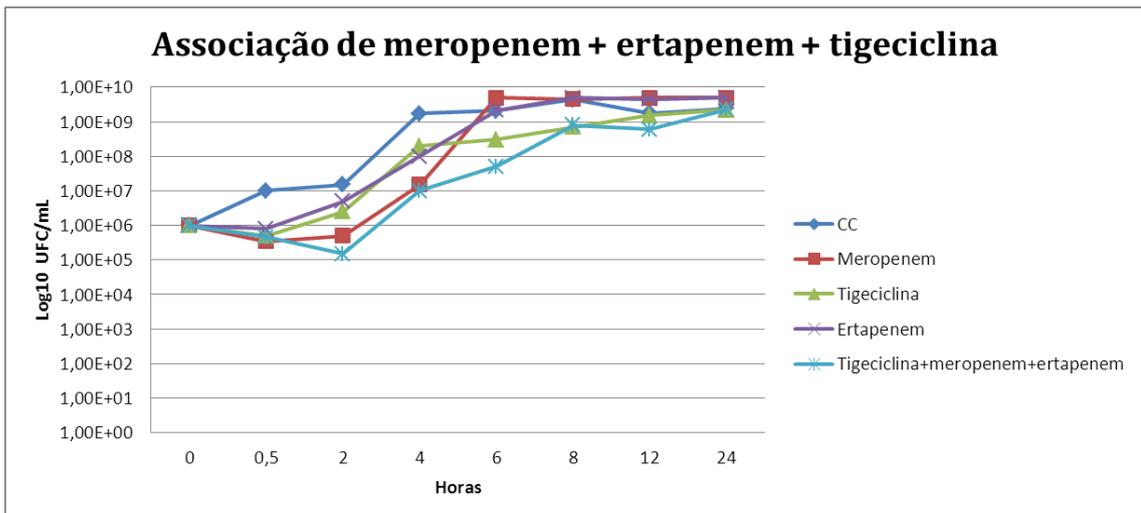
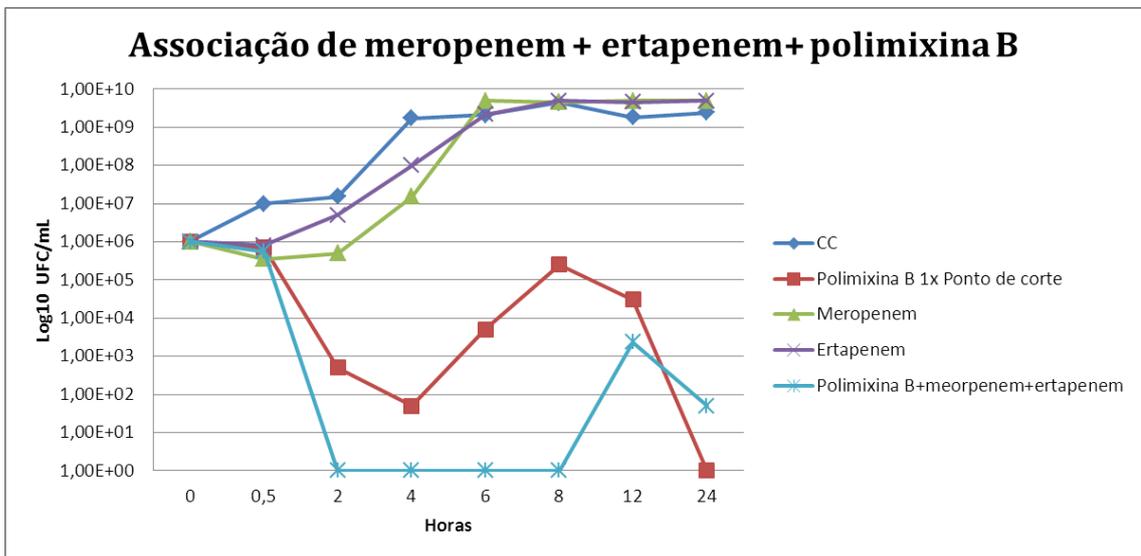
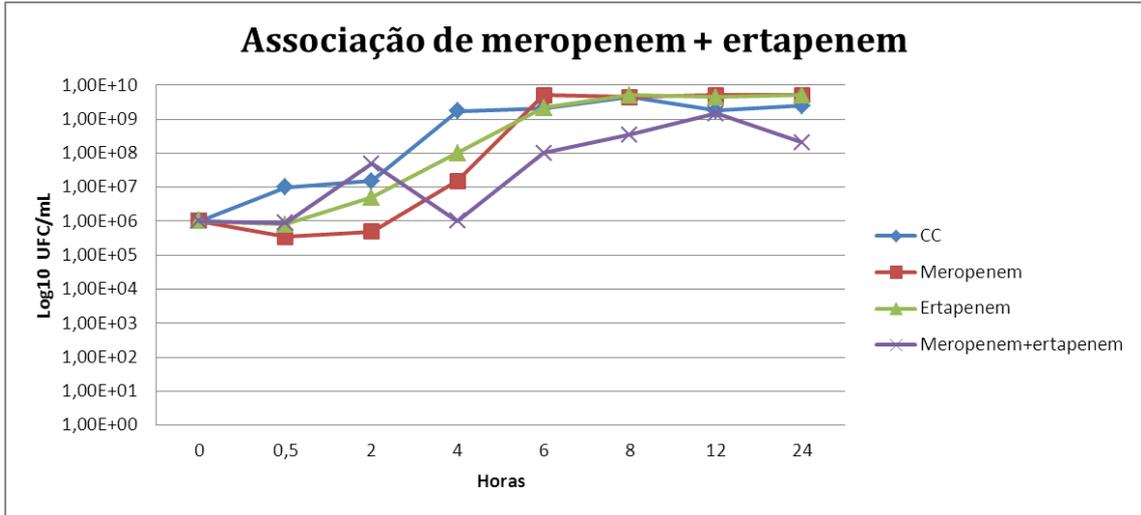
## 9 ANEXOS

ANEXO A: Ensaio *time kill curves* para cepa de *Enterobacter sp.* produtora de KPC

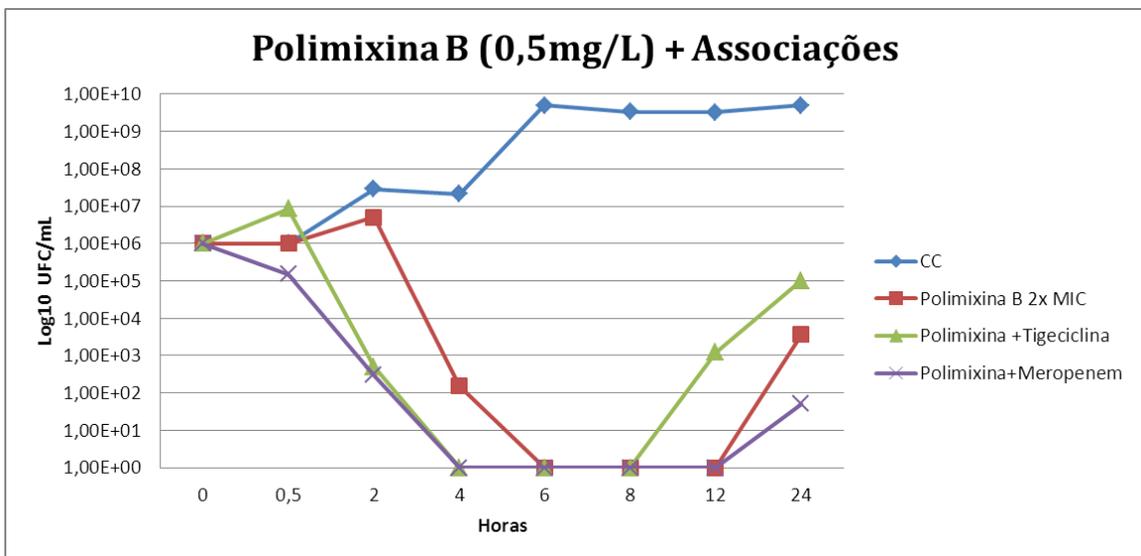
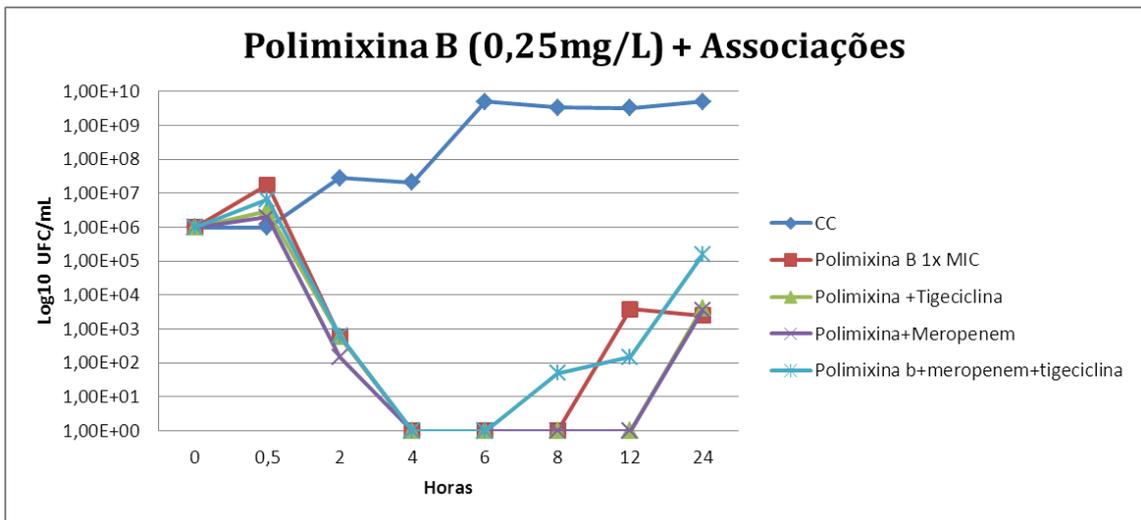
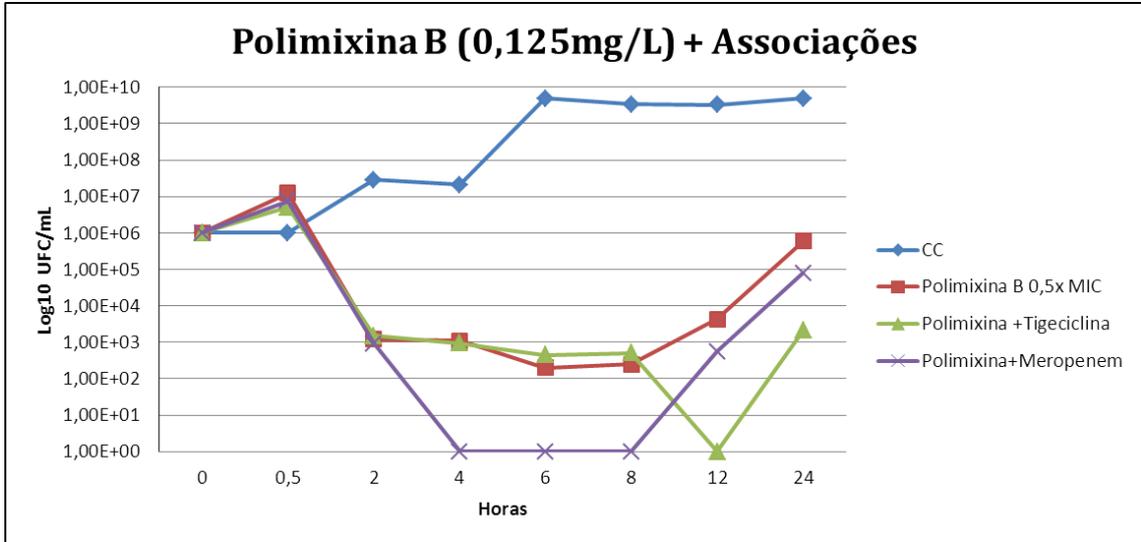


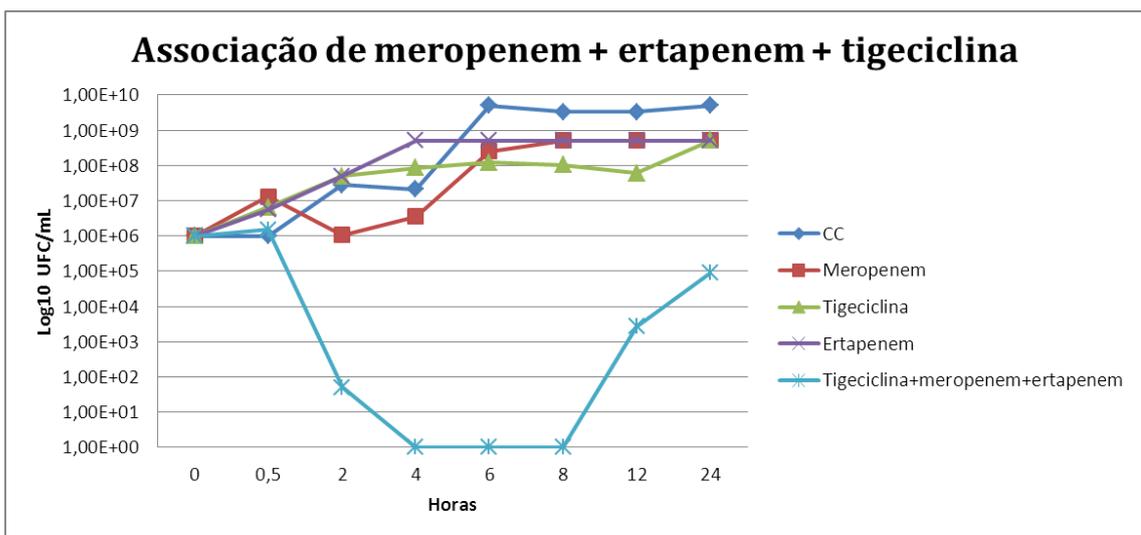
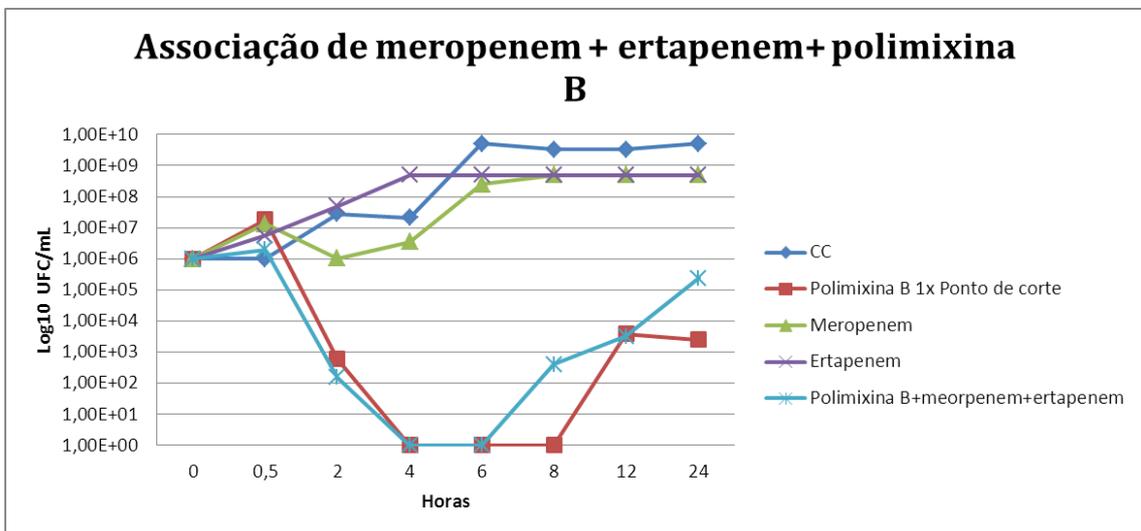
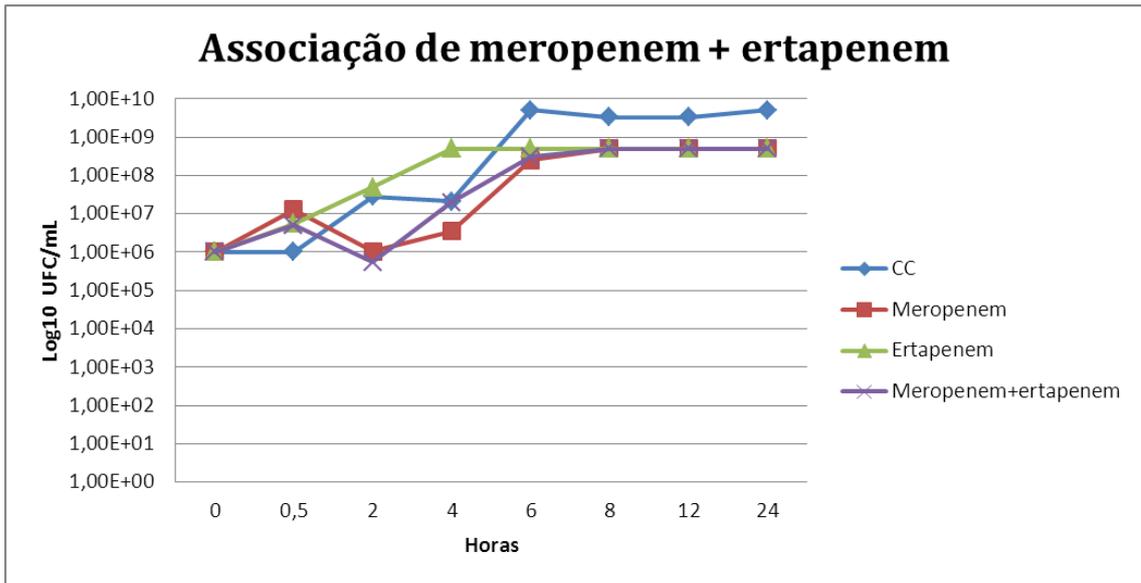
**ANEXO B: Ensaio *time kill curves* para cepa de *Enterobacter* sp. produtora de NDM**





**ANEXO C: Ensaio *time kill curves* para cepa de *Enterobacter sp.* produtora de OXA-48**





**ANEXO D: Ensaio *time kill curves* para cepa de *Enterobacter* sp. não produtora de carbapenemase (NPC)**

