

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Luana Boff

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E
IN VIVO EM MACROCOLÔNIAS DE *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*
PRODUTORAS DE NDM-1**

Porto Alegre

2016

Luana Boff

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E
IN VIVO EM MACROCOLÔNIAS DE *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*
PRODUTORAS DE NDM-1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Macedo

Porto Alegre

2016

Luana Boff

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E
IN VIVO EM MACROCOLÔNIAS DE *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*
PRODUTORAS DE NDM-1**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção - UFRGS

Dr^o. Rafael Schneider - UFCSPA

Prof^o. Dr^o. Alexandre Macedo - UFRGS (orientador)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo das etapas de formação de biofilme.....	13
Figura 2. Ilustração dos quatro diferentes tipos de biofilme encontrados na natureza, indústria e área médica.. ..	17
Figura 3. Macrocolônias de <i>S. typhimurium</i> crescidas em placas contendo Congo Red 26 °C por 48 h.....	18
Figura 4. Exemplo do método de avaliação de sinergismo Checkerboard.....	26
Figura 5. Exemplo do método de avaliação de sinergismo com fitas E-teste	27
Figura 6. Estágios do inseto <i>Galleria mellonella</i>	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	6
1.1 ENTEROBACTERIACEAE.....	6
1.1.1 <i>Complexo Enterobacter cloacae</i>	6
1.1.2 <i>Enterobacter hormaechei</i>	7
1.1.3 Patogenicidade.....	7
1.2. MULTIRRESISTÊNCIA	9
1.2.1 <i>Enterobacteriaceae</i> multirresistentes.....	10
1.2.2 NDM-1 (<i>New Delhi metallo-β-lactamases</i>).....	11
1.3. BIOFILMES	13
1.4 TIPOS DE BIOFILME	17
1.4.1 <i>Biofilmes em macrocolônias</i>	18
1.5. TERAPIA COMBINADA	20
1.5.1 <i>Re-emergência das polimixinas</i>	21
1.6. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> COM COMBINAÇÕES DE COMPOSTOS	23
1.6.1 <i>Método time-kill</i>	25
1.6.2 <i>Método checkerboard</i>	25
1.6.3 <i>Método utilizando fitas E-teste</i>	26
1.6.4 <i>Avaliação do sinergismo</i>	27
1.7. MODELO <i>IN VIVO</i>.....	29
1.7.1 <i>Modelos invertebrados</i>	29
1.7.2 <i>Galleria mellonella</i>	30
1.8. JUSTIFICATIVA	32
1.9. OBJETIVOS.....	33
1.9.1 <i>Objetivo geral</i>	33
1.9.2 <i>Objetivos específicos</i>	33
2. ARTIGO CIENTÍFICO	34
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VIRULENCE	53

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 ENTEROBACTERIACEAE

A família Enterobacteriaceae é composta por bacilos gram negativos, não esporulados, oxidase negativos e anaeróbios facultativos que são amplamente encontrados desde a natureza até a microbiota normal do trato gastrointestinal dos seres humanos (LARSEN *et al.*, 2003). Espécies como *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* fazem parte da família Enterobacteriaceae e são algumas das capazes de causar infecções em humanos (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015). Em 1960, Hormaeche e Edwards descreveram o gênero *Enterobacter* (LARSEN *et al.*, 2003), no qual a espécie de maior relevância clínica é o complexo *Enterobacter cloacae* (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012).

1.1.1 Complexo *Enterobacter cloacae*

O complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) é composto pelas espécies *E. cloacae*, *asburiae*, *hormaechei*, *kobei*, *ludwigii* e *nimipressuralis* (PAAUW *et al.*, 2008). Essas espécies são classificadas como um complexo pela sua similaridade com *E. cloacae* que é de 61% -67%, o que dificulta a diferenciação desses na clínica. (PAAUW *et al.*, 2008). Esse complexo é intrinsecamente resistente aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, cefalosporinas de primeira geração e cefoxitina devido à produção de AmpC (β -lactamase constitutiva). Além disso, possui a habilidade de adquirir outras formas de resistência como β -lactamases e carbapenemases, fazendo com que esse complexo seja de extrema importância na clínica (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012). Bactérias do CEC possuem características como flagelos peritríquios, fermentam a glicose produzindo ácido e gás, algumas cepas possuem cápsula, crescem rapidamente nos meios de cultura habituais e suas colônias são levemente mucoides (GRIMONT, F.; GRIMONT, P., 2006).

1.1.2 *Enterobacter hormaechei*

Dentro do CEC, a espécie mais frequentemente isolada na clínica é *E. hormaechei*. Essa espécie tem características como lactose positiva, D-sorbitol positiva, rafinose positiva e esculina negativa e foi primeiramente assim nomeada e identificada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (HOFFMANN *et al.*, 2005). *E. hormaechei* possui três subespécies *oharae*, *hormaechei* e *steigerwaltii* e as diferenças entre espécies e subespécies de *Enterobacter* são muito sutis, por isso, na clínica, geralmente, não são identificadas além do gênero, devido a confiabilidade dos métodos atuais para distingui-los rapidamente (HOFFMANN *et al.*, 2005).

Os Estados Unidos da América (EUA) relatam *E. hormaechei* como uma das principais causas de doenças nosocomiais em seu território (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012). Infecções por essa podem ser exógenas ou endógenas (visto que pode colonizar sem patogenicidade o trato gastrointestinal), sendo o maior fator de risco para infecção o uso prévio de antibióticos pelo paciente em questão (EUGENE SANDERS; SANDERS, 1997). Outros fatores de risco são tempo do paciente em unidade de tratamento intensivo (UTI), diabetes, imunossupressão e uso dispositivos médicos. Com o aumento de pacientes em UTI e da resistência a antimicrobianos, como citado anteriormente, a frequência de isolados de enterobactérias causando infecções em locais como o trato respiratório, trato urinário, ferimentos cirúrgicos e sangue vêm aumentando exponencialmente território (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012).

1.1.3 Patogenicidade

Os mecanismos de patogenicidade do gênero *Enterobacter* são pouco conhecidos e o que sabemos não é nada concreto. Visto que na era pré-antibióticos esse gênero não era conhecido por causar doenças nosocomiais, ainda não existem trabalhos suficientes sobre o assunto para elucidar a sua habilidade patogênica e de adquirir resistência a antimicrobianos. O que temos são diversos relatos sobre possíveis mecanismos utilizados por essas bactérias como a produção de endotoxinas, o que é esperado por serem bactérias gram-negativas, e também enterotoxinas (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012). Também se observou que quando inoculadas em modelo *in vivo*, esse gênero de bactérias pode produzir

alfa-hemolisina e citotoxinas formadoras de poros ativados por tiol (BARNES *et al.*, 1997). Estudos apontam, também, que o CEC possui genes do sistema de secreção tipo III, que é um importante fator na interação hospedeiro-patógeno. Isso pode contribuir com o estudo que mostra a possível indução de apoptose pelas bactérias do CEC (MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S., 2012). Foi elucidado que a formação de biofilme e colonização em superfícies pela família Enterobacteriaceae ocorre devido a fímbrias curli, responsáveis pela adesão e invasão nas células hospedeiras, sendo também um mecanismo de patogenicidade importante. (KIM, S. M. *et al.*, 2012; MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012; ZOGAJ *et al.*, 2003).

Como pudemos observar o estudo da patogenicidade do gênero *Enterobacter* é extremamente importante devido ao fato de ser grande causadora de doenças nosocomiais. Dentre os possíveis mecanismos de patogenicidade, a formação de biofilmes vem chamando atenção dos pesquisadores por ser extremamente difícil de tratar na clínica, principalmente devido ao fato de que essa forma de crescimento aumenta a resistência a antimicrobianos.

1.2. MULTIRRESISTÊNCIA

A resistência bacteriana não é um acontecimento novo, existem relatos de bactérias de ambientes isolados do contato com humanos por muitos anos e que possuem mecanismos de resistência a antimicrobianos (BHULLAR *et al.*, 2012; ZOWAWI *et al.*, 2015). Fatores como a expansão dos movimentos migratórios e aumento do uso indiscriminado de antimicrobianos são os principais pontos para compreendermos a crise quanto a resistência bacteriana que enfrentamos atualmente (LUTGRING; LIMBAGO, 2016). Essa emergência de resistência aos antimicrobianos atualmente disponíveis no mercado, principalmente quanto a bactérias gram-negativas, traz a ameaça do retorno da era pré-antibióticos em pleno século 21 (SAITO; SADOSHIMA, 2016).

Bactérias multirresistentes são definidas assim quando são resistentes a um ou mais antimicrobianos de três diferentes classes (ZOWAWI *et al.*, 2015). Desde a introdução da penicilina a resistência bacteriana aos antimicrobianos que foram lançados aconteceu em alguns anos. Ou seja, todo antimicrobiano lançado já tem um “prazo” para que surja resistência a esse (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007). Isso mostra a corrida contra o tempo que enfrentamos atualmente, pois a descoberta de novos compostos capazes de inibir o crescimento ou capazes de matar bactérias é relativamente lento comparado com o aparecimento de resistência aos disponíveis. Por exemplo, há mais de 40 anos não são desenvolvidas novas classes de antimicrobianos de relevância clínica. Pesquisadores vêm explorando novos horizontes de como a patogenicidade de determinadas bactérias acontece para que esses mecanismo sejam alvos de novas terapias e não mais o crescimento ou a viabilidade da célula em questão (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007). É sabido que a pressão seletiva dos antimicrobianos faz com que bactérias mais resistentes sejam selecionadas, assim, quando focamos em seu mecanismo patogênico e não em sua viabilidade, a célula não necessita mais adquirir mecanismos para manter-se viva, o que é seu objetivo primário. Assim podemos, talvez, evadir sua necessidade de criar mecanismos para resistir aos antimicrobianos ou novos compostos que tenham como alvo mecanismos da patogenicidade dessas, já que sua sobrevivência não está ameaçada (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007). Estratégias como a criação de inibidores enzimáticos são as maneiras que temos atualmente de contornar a resistência a classes como a dos beta-

lactâmicos. A associação entre amoxicilina e ácido clavulânico é usada mundialmente para aumentar a ação do antibiótico através da inibição das enzimas beta-lactamases pelo clavulanato (ZOWAWI *et al.*, 2015).

1.2.1 Enterobacteriaceae multirresistentes

A resistência de bactérias gram-negativas acontece principalmente devido a existência de enzimas beta-lactamases responsáveis por ligarem-se e desativarem os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (MORRILL *et al.*, 2015). A existência de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) na família Enterobacteriaceae existem desde os anos 80, porém os carbapenêmicos, da classe dos beta-lactâmicos, considerados de última escolha para tratamento de bactérias gram-negativas, foram efetivos por muitos anos no tratamento de cepas de Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs (ZOWAWI *et al.*, 2015). Porém, o surgimento de enzimas carbapenemases e a aquisição dos genes que codificam essas enzimas por cepas da família em questão, criou uma nova problemática envolvendo a multirresistência bacteriana.

A multirresistência na família Enterobacteriaceae vem crescendo exponencialmente e é reportada pelo CDC como uma ameaça urgente a saúde pública (MORRILL *et al.*, 2015). O aparecimento das carbapenemases nestas bactérias levou a evolução da resistência dessas, tornando-as, assim, bactérias de difícil tratamento com os antimicrobianos disponíveis atualmente. Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos, mundialmente conhecida como ECR, carregam frequentemente mecanismos de resistência a outras classes de antimicrobianos, além dos beta-lactâmicos (MORRILL *et al.*, 2015). As principais carbapenemases produzidas por essa família são New Delhi metalo- β -lactamases (NDM), Oxacilinase-48 (OXA-48) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (ZOWAWI *et al.*, 2015). Essa produção de enzimas ocorre ou por via cromossomal ou por aquisição de elementos móveis, como plasmídeos. A aquisição de genes de resistência por elementos móveis é de grande preocupação, devido à transferência horizontal responsável pela rápida disseminação dessas enzimas para bactérias antes susceptíveis. Ou seja, essa resistência pode facilmente se espalhar pela comunidade, aumentando à densidade de bactérias carreadoras de genes de resistência através de elementos móveis (LUTGRING; LIMBAGO, 2016).

O CDC reporta que, nos EUA, mais de nove mil infecções associadas com cuidados na saúde são causadas pelos dois tipos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ECR) mais comuns, *Klebsiella* e *Escherichia*. Essas infecções são extremamente preocupantes, pois resultam em altas taxas de mortalidade, variando de 18-48%, dependendo da terapia utilizada (MORRILL *et al.*, 2015). O CDC também relata que 50% dos pacientes que desenvolvem infecções sanguíneas pelas bactérias do ECR vão morrer devido a essa infecção (ZOWAWI *et al.*, 2015). Esses dados alarmantes e as opções limitadas de tratamento para infecções causadas pelo CRE fizeram pesquisadores e clínicos a explorar opções mais imediatistas, visto que o desenvolvimento de novos antimicrobianos é lento, como a reutilização de antimicrobianos como a classe das polimixinas e dos aminoglicosídeos (MORRILL *et al.*, 2015).

1.2.2 NDM-1 (New Delhi metalo- β -lactamases)

O gene *bla*_{NDM} pode ser carregado por vários plasmídeos, raramente é integrado ao cromossomo, e esses elementos móveis também podem conter vários outros genes de resistência (NORDMANN *et al.*, 2011). Já foram descritas 16 variantes da enzima NDM e embora a maioria das cepas produtoras de NDM pertença à família Enterobacteriaceae, essa carbapenemase já foi relatada em *Acinetobacter spp* e *Pseudomonas aeruginosa* causando importantes infecções nosocomiais. Isolados de enterobactérias produtoras de NDM-1 podem causar diferentes infecções como no trato urinário e pulmonares, bacteremia, peritonite, infecções de tecido mole e infecções associadas a dispositivos médicos (NORDMANN *et al.*, 2011). Essa enzima é inibida por EDTA e não é inibida pelo clavulanato (Narayanan *et al.*, 2016). São inibidas por EDTA, pois esse é um quelante e essa classe de enzimas contém íons metálicos de zinco (ZOWAWI *et al.*, 2015).

A primeira NDM foi identificada em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* de um mesmo paciente, na Suécia em 2008 (YONG *et al.*, 2009). No Brasil o primeiro relato de NDM-1 foi em 2013, em uma cepa de *Providencia rettgeri*, em um hospital do Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014). Um estudo retrospectivo realizado nesse hospital avaliou cepas resistentes aos carbapenêmicos isoladas em 2012 e seis dessas eram de *E. hormaechei subsp. oharae* NDM-1 positivas. Essas cepas foram isoladas de pacientes

assintomáticos, por swabs retais, e do ambiente, em uma pia do hospital (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014).

Isolados produtores de NDM-1 foram descritos pelo mundo todo e em muitos casos a fonte da contaminação foi identificada na Índia. Enquanto muitos destes pacientes tinham história de hospitalização na Índia, Paquistão ou Bangladesh, outros apenas viajaram para esta região. Isso sugere a aquisição de bactérias produtoras de NDM pela ingestão de água contaminada o que resultou na colonização intestinal (KHAN & NORDMANN, 2012).

1.3. BIOFILMES

Biofilmes são agregados tridimensionais de microcolônias compostas de microorganismos, bactérias e/ou fungos, capazes de produzirem e excretarem uma matriz exopolimérica, que garante proteção a esses e adesão a superfícies bióticas e abióticas (KIM, S. M. *et al.*, 2012). Esse complexo, quando maduro, é conhecido por configurar uma maior tolerância ao estresse exógeno, resposta imune, a antibióticos e biocidas (KIM, S. M. *et al.*, 2012). As células bacterianas planctônicas (de vida livre) e as células do biofilme diferem fisiologicamente e geneticamente. As propriedades físicas dos biofilmes são determinadas pela matriz exopolimérica e as propriedades patológicas pelas características das bactérias que formam esse biofilme. A população bacteriana que cresce em biofilme é composta por uma subpopulação heterogênea de células em diferentes estágios de crescimento (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016).

Além das diferenças na fase de crescimento, as células do biofilme também são heterogêneas em relação à disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Assim, a maioria das células se concentra próxima à fonte de nutrientes e ao oxigênio, enquanto a minoria do crescimento acontece no interior do biofilme (STOODLEY, P *et al.*, 2002). A formação do biofilme pode ser dividida em cinco estágios: (1) adesão inicial da bactéria à superfície, que configura um processo reversível (se a bactéria estiver aderida a uma célula eucariótica pode ocorrer a invasão celular, ou então a via da formação de biofilme), (2) a adesão irreversível com produção de matriz exopolimérica, (3) o desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme (formação de microcolônias), (4) a formação do biofilme maduro e a (5) dispersão de células planctônicas desse biofilme (STOODLEY, P *et al.*, 2002). Esses passos estão ilustrados na figura 1.

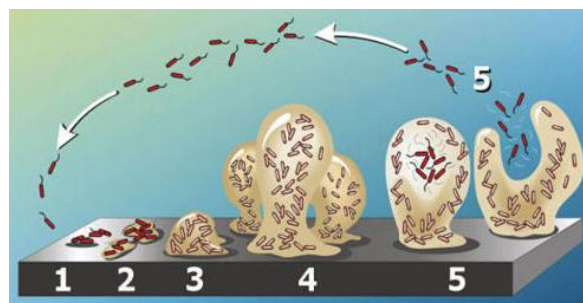


Figura 1. Exemplo das etapas de formação de biofilme (STOODLEY, P *et al.*, 2002).

A adesão, mediada principalmente por fimbrias e/ou curli, pode ser desde superfícies bióticas, como nos dentes ou no pulmão de pacientes com fibrose cística, até superfícies abióticas, como marca-passos e cateteres urinários (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016). Infecções relacionadas a dispositivos médicos e associadas a biofilmes são as doenças nosocomiais mais frequentes. O CDC estima que, até 2015, só em suas instalações americanas, foram detectadas 560.000 infecções do trato urinário associadas a cateteres, em que o principal fator de risco para a patogênese é a formação de biofilme no cateter (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016). A adesão inicial do biofilme é dinâmica e reversível, ou seja, permite que a bactéria abandone a superfície e retorne ao estado planctônico. Já a adesão irreversível é caracterizada pela ligação permanente a superfícies pela produção da matriz exopolimérica (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016).

A matriz exopolimérica, mais conhecida como EPS (extracellular polymeric substances), corresponde a aproximadamente de 75-80% do biofilme e é composta principalmente de polissacarídeos, além de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016). Os EPS têm diferentes funções dentro do complexo biofilme, podendo influenciar de maneira física ou comportamental nesse, como: adesão, dispersão, força mecânica, resistência a antibióticos, degradação enzimática, conexão entre células, interação entre microcolônias do biofilme, tolerância e troca de material genético. Existe uma forte associação física do EPS com o DNA das bactérias nos biofilmes, o que cria uma barreira capaz de interromper a penetração de moléculas, como as de antibióticos ou biocidas (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016; STOODLEY, P *et al.*, 2002).

Essas moléculas também são capazes de atuar como uma resina de troca iônica, causando mudança na carga de agentes que não conseguirão penetrar no biofilme. Dessa maneira, podemos perceber porque as chances de sobrevivência das células mais embebidas dentro da matriz de EPS são maiores do que as mais expostas (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016). Condições ambientais influenciam na produção de EPS e na formação de biofilme, porém o que é mais comumente disseminado na literatura é que o tipo de bactéria que compõem o biofilme é o que mais influencia nessas duas características. Por exemplo, *P. aeruginosa* é uma bactéria que forma biofilmes de maneira excelente, produz uma EPS constituída alginato, lactobacilos, glucanos e frutanos (MURUGAN; SELVANAYAKI; AL-SOHAIBANI, 2016).

A expansão destas microcolônias no biofilme depende de mecanismos de sinalização celular que monitoram a densidade populacional, como o quórum sensing (HALL-STOODLEY; STOODLEY, P *et al.*, 2002). Através desse mecanismo ocorre a comunicação pela qual as bactérias regulam a expressão de genes especializados em resposta à densidade populacional. O quórum sensing depende da síntese de pequenas moléculas denominadas de auto indutores, cuja produção aumenta de acordo com o aumento da densidade populacional. Esse mecanismo regula diversos processos fisiológicos incluindo “swarming”, biossíntese de antibióticos, transferência de plasmídeos conjugais e produção de fatores de virulência (HARDMAN; STEWART; WILLIAMS, 1998).

No biofilme maduro a comunidade formada troca e compartilha produtos que desempenham uma função essencial na manutenção da arquitetura do biofilme e proporcionam um ambiente favorável para as bactérias que o habitam. Nessa fase, a maioria das células apresenta crescimento lento ou até ausência de crescimento, isso ocorre pela liberação de fatores em resposta ao estresse (HALL-STOODLEY; STOODLEY, Paul, 2002). Assim, observamos, novamente, que células dentro de um biofilme são diferentes fisiologicamente. Quando o biofilme é capaz de se diferenciar começa a dispersão de células planctônicas. As bactérias da comunidade conseguem perceber mudanças ambientais, como disponibilidade de nutrientes, aumento de produtos tóxicos, oscilações de oxigênio, e avaliam se é mais benéfico ficar no biofilme ou retornar à forma livre (STOODLEY *et al.*, 2002).

Como dito anteriormente, biofilmes podem estar associados com infecções em superfícies abióticas como dispositivos médicos. O interesse nessas infecções pode ser explicado pelo grande impacto que as infecções associadas a biofilme têm na saúde pública. De acordo com o CDC, somente nos EUA o número anual de infecções hospitalares adquiridas envolvendo micro-organismos em biofilme é estimado em 1,7 milhões resultando em um aumento de U\$ 11 bilhões nos custos hospitalares (RÖMLING *et al.*, 2014). O custo anual envolvendo infecções associadas a biofilme nos EUA é estimado em U\$ 94 bilhões resultando em mais de 500 mil mortes (RÖMLING *et al.*, 2014). O diagnóstico e tratamento clínico das infecções associadas a biofilme são difíceis pela falta de procedimentos padrões.

Os métodos de cultura e avaliação de suscetibilidade utilizados não avaliam o biofilme, mas sim apenas células individuais. Como citado anteriormente, células planctônicas são fisiologicamente diferentes das células aderidas e é devido a isso a grande chance de falha terapêutica no tratamento de infecções associadas a biofilme. A medida mais

adotada em infecções relacionadas a dispositivos médicos e biofilmes geralmente é a remoção do dispositivo. Vimos que biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos do que células livres pela produção da matriz exopolimérica, transmissão de genes de resistência, inativação por alta concentração de iônica, baixo pH e presença de células metabolicamente inativas que sobrevivem ao tratamento. A fim de contornar a problemática da resistência aos antimicrobianos e das doenças nosocomiais associadas a biofilmes é necessário o desenvolvimento de terapias capazes de inibir ou bloquear fatores de virulência. Essa forma de pensamento, sem matar a bactéria e nem inibir seu crescimento, ganha destaque nos últimos anos, porque evita a pressão seletiva dos antibióticos e, assim, pretende-se reduzir a resistência bacteriana (JUMA; FORSYTHE, 2015).

1.4 TIPOS DE BIOFILME

Biofilmes podem formar-se em diferentes ambientes, exigindo que existam distintas formas de avaliar seu complexo processo de formação. Características como a superfície em que está inserido, a distribuição de nutrientes, o oxigênio e a água influenciam na sua maneira de formação e organização, existindo, então, diferentes tipos de biofilme (SERRA; HENGGE, 2014). A forma mais conhecida de formação de biofilmes é a de submersão. Em laboratório, essa forma é feita em placa 96 poços, crescendo na superfície sólida da placa, embebido em meio de cultura nutriente. Esse sistema mimetiza, na prática, o crescimento em superfícies de dispositivos médicos e de ambientes líquidos. O biofilme de crescimento em película é utilizado para avaliação da formação em ecossistemas aquáticos, em laboratório é feito através do desenvolvimento na interface entre líquido e ar. Biofilmes subaéreos crescem em superfícies sólidas, como rochas e prédios na presença de micronutrientes. Já o biofilme em macrocolônias cresce em matérias orgânicas em decomposição, como solos ou alimentos. Em laboratório, sua avaliação é feita através de crescimento em placas de ágar semissólido (SERRA; HENGGE, 2014) (Figura 2.).

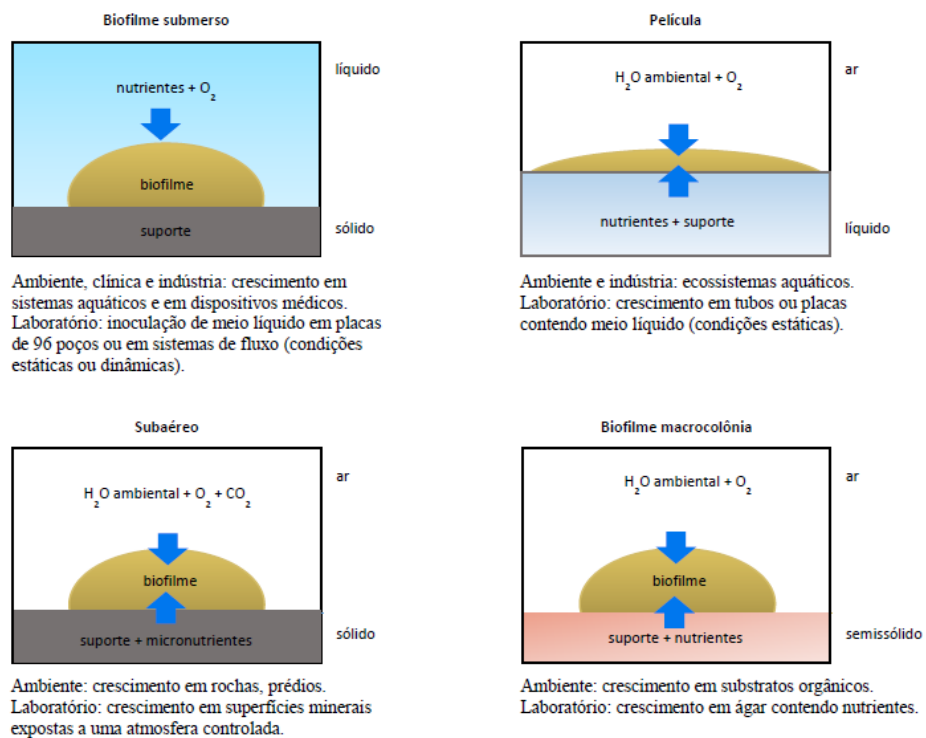


Figura 2. Ilustração dos quatro diferentes tipos de biofilme encontrados na natureza, indústria e área médica. Adaptado de Serra & Hengge, 2014.

1.4.1 Biofilmes em macrocolônias

Biofilmes bacterianos são comunidades multicelulares estruturadas cuja adesão envolve flagelos e componentes da matriz extracelular como fímbrias, fímbrias tipo curli e exopolissacarídeos. Também é sabido que biofilmes contêm zonas morfológica e fisiologicamente distintas. Já em 1987 havia relatos de diferentes padrões na formação de macrocolônias por *E. coli* e células de diferentes tamanhos em distintas partes dessas macrocolônias (SHAPIRO, 1987). Como dito anteriormente, diferentes bactérias têm diferentes capacidades de formação de biofilme e uma característica que é envolvida nisso é a produção de matriz extracelular para adesão bacteriana.

Bactérias entéricas, como as enterobactérias, expressam diferentes moléculas de adesão em sua matriz extracelular. Por exemplo, em *Salmonella typhimurium* e *E. coli* o principal componente proteico da matriz extracelular é a proteína curlina seguida pela celulose (BARNHART; CHAPMAN, 2006). Esses morfotipos podem ser visualizados em macrocolônias em ágar contendo corante Congo Red (CR) (ZOGAJ *et al.*, 2003).

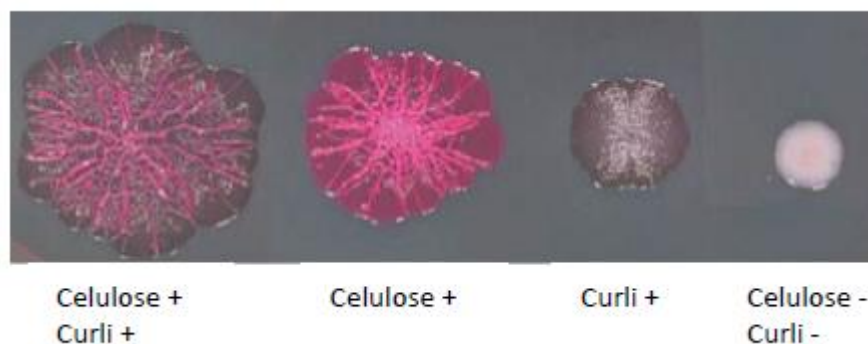


Figura 3. Macrocolônias de *S. typhimurium* crescidas em placas contendo Congo Red 26 °C por 48 h (BARNHART; CHAPMAN, 2006).

No estudo de macrocolônias de Serra *et al.* 2013, é apontado que a morfologia das células bacterianas varia de acordo com a distribuição de nutrientes no biofilme, formando diferentes zonas conforme a fonte de nutrientes. Nas camadas inferiores e nas bordas do biofilme em macrocolônia, zonas próximas ao ágar, a morfologia das células indicou fisiologia de crescimento pós-exponencial (células alongadas com flagelos). Na parte mais interna e nas camadas superiores, onde os nutrientes eram limitados, as células bacterianas exibiram características morfológicas da fase estacionária (células ovoides produzindo curli). Por fim, a camada intermediária apresentou heterogeneidade, formando uma zona de

transição, na qual foram encontradas células ovoides produzindo curli e células sem flagelos e nem curli (essas, provavelmente, estão na fase de transição entre a perda do flagelo e o início da produção de curli) (SERRA *et al.*, 2013).

Esses achados evidenciam a importância da utilização do modelo de macrocolônias para a avaliação das diferentes regiões morfológicas dentro do biofilme, características que as demais formas de avaliação não oferecem. É extremamente difícil avaliar a arquitetura desenvolvida pelo biofilme, as diferentes condições ambientais em que células que nele habitam estão expostas e as diferentes possíveis morfologias dessas células. Todas essas características podem ser avaliadas no modelo de macrocolônia, ajudando a elucidar diferentes questionamentos que não são possíveis no modelo mais utilizado de crescimento de biofilmes, o submerso (SERRA; HENGGE, 2014).

1.5. TERAPIA COMBINADA

Um dos maiores problemas enfrentados na clínica é o tratamento de bactérias gram-negativas multirresistentes (ELEMAM; RAHIMIAN; DOYMAZ, 2010). Como a produção de novos agentes antimicrobianos, principalmente almejando bactérias gram-negativas, tem diminuído, existe a emergência de novas terapias que possam combater a multirresistência aos antibióticos disponíveis no mercado. É nesse contexto que a utilização da terapia combinada de antimicrobianos representa uma alternativa promissora.

Um exemplo de terapia combinada protocolada e utilizada mundialmente é a do tratamento da tuberculose. Causada pela espécie *Mycobacterium tuberculosis*, essa doença é disseminada mundialmente e a Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que, devido ao uso da terapia combinada em seu tratamento 43 milhões de vidas foram salvas no período de 2000 a 2014. Os antibióticos usados na terapia combinada padronizada são isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. A OMS também relata que existem cepas resistentes a essa terapia de primeira instância e que antimicrobianos de segunda linha são uma opção, mas que essa não tem a mesma chance de efeito positivo. Em 2014, 480 mil pessoas adquiriram *M. tuberculosis* multirresistente no mundo. Esses dados levaram pesquisadores voltarem a testar diferentes combinações de terapias a fim de conseguir um melhor desfecho para pacientes infectados com esse micro-organismo multirresistente (ZHAO *et al.*, 2016).

Uma das bactérias mais estudadas em pesquisas de terapias combinadas é *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (BAE *et al.*, 2016; BREMMER *et al.*, 2016; LI, J. *et al.*, 2006; WANG, Y. *et al.*, 2014). Essa bactéria gram-negativa, quando causando doenças nosocomiais é de morbidade e mortalidade significativa (BREMMER *et al.*, 2016). A terapia combinada também é extensamente utilizada para achar uma terapêutica que combata *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, visto que sua patogenicidade é alta. Nos EUA ele é um dos principais causadores de doenças nosocomiais, além de estar intimamente relacionado a infecções adquiridas através de dispositivos médicos, sendo também capaz de ser adquirido na comunidade. Dentro da família Enterobacteriaceae, existem pesquisas na literatura principalmente quanto à espécie *K. pneumoniae* (BRATU *et al.*, 2005; ELEMAM; RAHIMIAN; DOYMAZ, 2010; KU *et al.*, 2015; LEE, C. R. *et al.*, 2016; TÄNGDÉN *et al.*, 2014; WANG, X. *et al.*, 2015). Desde que surgiram cepas produtoras de KPC houve a

necessidade de que também fossem avaliadas outras estratégias para combate dessa espécie multirresistente.

1.5.1 Re-emergência das polimixinas

Nesse contexto, de diferentes bactérias multirresistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado e da falta de novos compostos capazes de matar essas bactérias, pesquisadores vêm estudando o uso novamente das polimixinas. Esse antimicrobiano foi usado na década de 50 e teve seu uso suspenso após alguns anos devido a observação da alta toxicidade, principalmente nefro e neurotoxicidade, desse composto (LI, J. *et al.*, 2006). Como seu uso foi suspenso durante muito tempo, acredita-se que as bactérias multirresistentes sejam susceptíveis a esse antibiótico ou, pelo menos, não possuam mecanismos para inibir sua ação, fazendo desse um potencial agente para ser usado em combinação de terapias (LI, J. *et al.*, 2006).

Com o foco novamente nessa classe de antimicrobianos, foram conduzidos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que constataram que a toxicidade desses compostos está relacionada com a dosagem (LI, J. *et al.*, 2006). Esses compostos, em monoterapia, geralmente não atingem concentrações plasmáticas suficientes para que possam inibir o crescimento das bactérias e isso desenvolveria uma rápida resistência dessas bactérias que não foram eliminadas por esse antimicrobiano. A combinação dessa classe com outros antimicrobianos pode beneficiar a farmacodinâmica desse e causar um efeito sinérgico nessa combinação (LI, J. *et al.*, 2006). A sinergia entre compostos pode acontecer de duas maneiras: um composto mata a subpopulação que resistiu a ação do outro composto em questão ou pelo aumento da eficiência dos dois compostos em questão, atuando em diferentes locais na bactéria um composto aumenta ou estende a chance do outro de erradicar a bactéria (LANDERSDORFER *et al.*, 2013). Outra consideração a ser feita é que como as polimixinas atuam na membrana das bactérias, esse composto pode diminuir o efeito de mecanismos de resistência de bactérias amplamente conhecidos, como as bombas de efluxo (BERGEN *et al.*, 2015).

A classe das polimixinas tem propriedades detergentes catiônicas e seu mecanismo de ação é através da alteração da membrana celular externa das bactérias. Dito isso, essa classe é,

principalmente, utilizadas em bactérias gram-negativas. Não existem valores definidos de resistência ou susceptibilidade universalmente aceitos para essa classe quanto a bactérias da família Enterobacteriaceae. Portanto, para avaliação do seu uso aplicado a infecções causadas por essa família, clínicos e pesquisadores tem de definir seus próprios valores de resistência e susceptibilidade. Alguns estudos usam os valores de outras bactérias como *P. aeruginosa*, sendo 2 mg/L susceptível, para avaliações de bactérias sem valores definidos (ELEMAM; RAHIMIAN; DOYMAZ, 2010). Existem duas polimixinas disponíveis no mercado, colistina e polimixina B (LI, J. *et al.*, 2006). Estudos variam quanto à escolha entre elas para tratamentos e avaliação de terapias combinadas, porém no Brasil prevalece o uso da polimixina B na clínica (RIGATTO *et al.*, 2016).

A utilização das polimixinas na terapia combinada vem sendo estudada, geralmente, junto com os antimicrobianos rifampicina, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos (BERGEN *et al.*, 2015). A terapia combinada entre esses antibióticos já foi avaliada para diferentes gêneros multirresistentes citados anteriormente (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) e para outros (BERÇOT *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2010). O sinergismo dos antimicrobianos pode ser avaliado por diferentes metodologias.

1.6. ESTUDOS *IN VITRO* COM COMBINAÇÕES DE COMPOSTOS

Para uma melhor abordagem no tratamento de infecções relacionadas com biofilmes, a avaliação em conjunto de resultados da clínica e da pesquisa é necessária (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; PRODUCING, 2016). As condições *in vitro* utilizadas nos laboratórios para avaliação de inibição e erradicação de biofilmes estão conectadas com os resultados obtidos, ou seja, diferentes métodos utilizados trazem diferentes resultados dependendo das condições utilizadas (CHEN, L.; WEN, 2011; PARSEK; SINGH, 2003). Isso mostra a dificuldade eminente de padronização da metodologia para pesquisa, além disso, os resultados obtidos *in vitro* não consideram todas as condições em que as bactérias serão expostas no hospedeiro.

O consenso entre a prática clínica e a pesquisa é que a detecção da infecção associada ao biofilme deve ser identificada da forma mais rápida possível (CHEN, L.; WEN, 2011). Assim como não existem métodos padronizados para erradicação e inibição de um biofilme, também não existem para identificação de uma possível infecção por essa forma de crescimento bacteriano. Parsek & Singh protocolaram quatro critérios, que são adotados por alguns microbiologistas clínicos ao redor do mundo, para a detecção de biofilmes na clínica: a bactéria deve estar associada a superfícies ou aderida a um substrato, o exame bacteriológico deve revelar aglomerados bacterianos embebidos em uma matriz ou constituintes celulares do hospedeiro, a infecção deve ser localizada e a infecção deve ser resistente ao tratamento mesmo com a susceptibilidade de células sésseis (PARSEK; SINGH, 2003). Esses critérios são básicos no conhecimento da formação e da patogenicidade de biofilmes e como é difícil conseguir amostras íntegras do biofilme na coleta clínica, alguns desses critérios são difíceis de atender, estendendo o tempo de identificação da infecção por biofilme. Além disso, o critério de infecção localizada, às vezes, pode não ser identificado devido à capacidade do biofilme de causar inflamação nos tecidos adjacentes (CHEN, L.; WEN, 2011).

Essa habilidade do biofilme de causar inflamações prejudica além da área propriamente dita da infecção e, ainda, é responsável pelas características da infecção crônica causada por biofilmes (CHEN, L.; WEN, 2011). Um estudo com 80 pessoas, utilizando cateter para diálise peritoneal, mostrou que mesmo que haja formação de biofilme nesse dispositivo, células planctônicas foram as responsáveis por causar peritonite aguda,

inflamação no abdome (CHEN, L.; WEN, 2011). Isso mostra o porquê se pensa em uma combinação de diferentes componentes para tratamentos de biofilmes, como ocorre no tratamento da tuberculose, em que se considere a inflamação e infecção tanto das células do biofilme quanto das planctônicas.

Um artigo de W. Edmund Farrar Jr. e Jane K., de 1973 mostra uma das terapêuticas que ainda é a mais estudada para a tentativa de erradicação de bacilos gram-negativos multirresistentes, a avaliação de sinergismo entre antibióticos. A combinação de diferentes compostos, por exemplo, antibióticos da classe dos beta-lactâmicos e compostos que inibem a ação de beta-lactamases, como ácido clavulânico, vem sendo uma estratégia para combater a crescente resistência das bactérias aos antibióticos disponíveis no mercado (FARRAR; NEWSOME, 1973). Existem diferentes técnicas para a avaliação de possível sinergismo entre compostos contra bactérias, mas as principais e mais utilizadas são o método time-kill, checkerboard e E-test. Diversos estudos comparam as três metodologias e mostram que existe discordância entre elas, mas que cada uma dessas tem suas vantagens e desvantagens, sendo difícil escolher uma dessas como o padrão a ser utilizado (BREMNER *et al.*, 2016; WHITE, R L *et al.*, 1996; ZUSMAN *et al.*, 2013). Diferentes bactérias responderão de forma distinta às combinações de compostos, não sendo, portanto, uma definição estática o resultado dos métodos de combinação de compostos. Ou seja, se determinada combinação funciona para uma cepa de Enterobactérias produtoras de KPC, não significa que essa combinação também funcionará para Enterobactérias produtoras de NDM-1.

Alguns estudos sugerem que o método time-kill é o mais preciso entre os disponíveis, porém ele é demasiado demorado e exige um extenso trabalho braçal, o que faria dele irreprodutível na clínica (WHITE, R L *et al.*, 1996). Isso mostra a vantagem do método de checkerboard, onde são aferidas as combinações de compostos em placa de 96 poços e avaliação da sobrevivência ou morte das bactérias após 18-21 h (HSIEH *et al.*, 1993; RAND *et al.*, 1993). A utilização de fitas E-test também é um teste de rápido resultado, visto que as fitas são pré-prontas com diferentes concentrações de antibióticos nessas, e o sinergismo, ou a falta dele, é observada apenas por se a bactéria cresceu ou não no ágar em que as fitas foram postas (WHITE, R L *et al.*, 1996). Esse método exhibe a desvantagem de as fitas apresentarem um maior custo, comparado com a diluição de antibióticos utilizada nos outros dois métodos apresentados.

1.6.1 Método time-kill

O método time-kill testa os compostos em combinado e sozinhos em concentrações que variam, por exemplo, de $\frac{1}{4}$ a 2 x a MIC (concentração inibitória mínima) desses. Isso resulta em diferentes combinações a serem testadas para o micro-organismo em questão. O inóculo é definido e seu volume também, para que posteriormente possam ser considerados na diluição e na distribuição desses em placa de ágar Mueller-Hinton (MHA). Os antimicrobianos são adicionados, sozinhos e o combinados, ao inóculo e incubados sob agitação, geralmente a 35 °C por 24h. São coletadas amostras em diferentes tempos, sendo no mínimo coletadas nos tempos 0 e 24h, diluídas 10 x, pipetadas em placas MHA e incubadas para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e definição do sinergismo. Assim, podemos ver o extenso trabalho que esse método exige e como ele torna-se inviável em diferentes níveis na prática clínica (WHITE, R L *et al.*, 1996).

1.6.2 Método checkerboard

O método checkerboard pode utilizar concentrações de, por exemplo, $\frac{1}{32}$ a 4 x a MIC dos compostos a serem avaliados. Os compostos são pipetados de maneira decrescente na placa de 96 poços e, após isso, adiciona-se o inóculo. Após um determinado tempo, que pode variar de 18-21 h, as placas são verificadas visualmente ou pela leitura da densidade ótica, para determinação do poço em que houve sinergismo entre duas concentrações dos diferentes antimicrobianos. Ou seja, apenas um poço determinará o sinergismo, o que traz a tona uma das desvantagens desse método, pois a relevância estatística de considerar apenas um poço, de 96 para determinação de sinergismo, torna-se baixa. Outra desvantagem desse método é que ele permite diferentes interpretações, como qual o poço que realmente é sinérgico e impede o crescimento das bactérias, gerando controvérsias entre estudos sobre esse método (HSIEH *et al.*, 1993; WHITE, R L *et al.*, 1996).

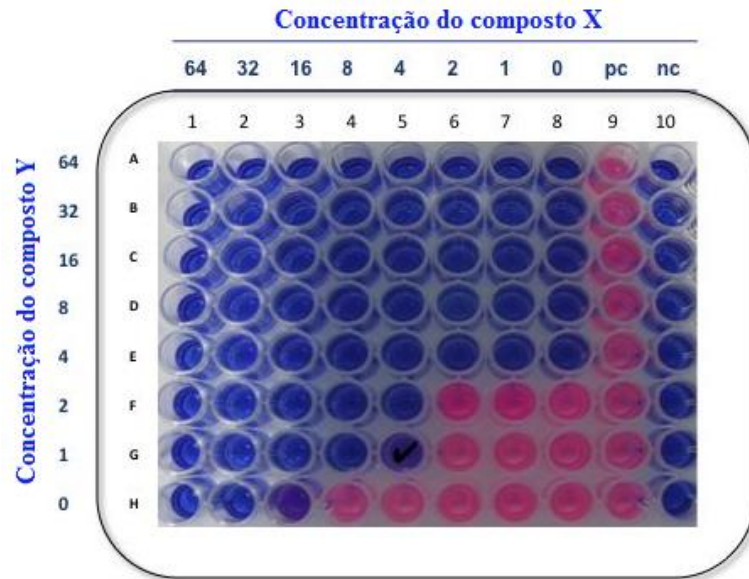


Figura 4. Exemplo do método de avaliação de sinergismo checkerboard. Adaptado de <http://www.ibg.kit.edu/nmr/247.php> Acesso em: 05 de outubro de 2016.

1.6.3 Método utilizando fitas E-teste

O método de E-teste é o mais simples de todos. As fitas são postas em cruz em placa de ágar MH, formando um ângulo de 90° na interseção das MICs dos dois compostos em questão. As placas são incubadas de 18-21 h e o sinergismo é definido como a zona de inibição onde é observado a MIC do combinado, como mostra a figura 5 (WHITE, R L *et al.*, 1996). Como citado anteriormente, esse método exibe a desvantagem de as fitas apresentarem um custo elevado.

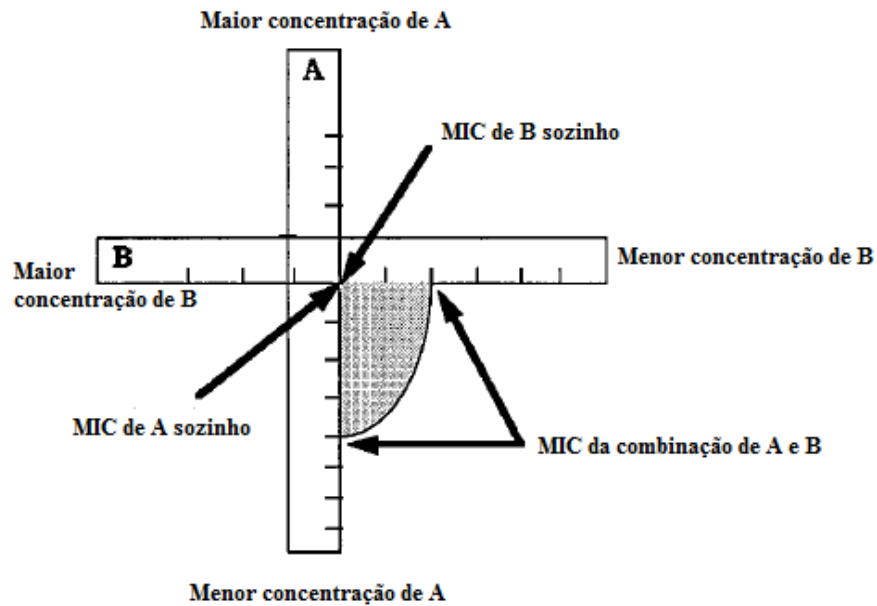


Figura 5. Exemplo do método de avaliação de sinergismo com fitas E-teste. Figura adaptada de White et al. 1996.

A forma como são operados cada um dos três métodos muda um pouco conforme os diferentes estudos apresentados na literatura, mas em resumo o que acontece em suas realizações é o que foi citado acima. Assim, observamos que cada um tem suas particularidades, vantagens e desvantagens. Para escolher entre esses métodos para avaliação de sinergismo entre compostos é preciso considerar pontos como para o que ele será realizado (clínica ou pesquisa), que micro-organismo está sendo avaliado (pelo tempo de crescimento de cada um e particularidades genéticas, principalmente), mão de obra a ser utilizada, tempo a ser despendido, custo benefício entre outros (WHITE, R L *et al.*, 1996).

1.6.4 Avaliação do sinergismo

Ao final do teste checkerboard e E-test é realizado um cálculo chamado FIC index. Esse cálculo avalia a concentração inibitória fracional (FIC) dos antimicrobianos utilizados e, posteriormente, soma o FIC desses resultando no FIC index. O FIC é calculado da seguinte forma para os métodos checkerboard e E-test: MIC do composto sozinho / MIC do composto na combinação. Existem diferentes formas de interpretar se há ou não sinergismo, alguns autores utilizam um FIC index de < 1 para sinergismo e outros ≤ 0.5 . Indiferença é considerado do FIC index final de sinergismo (sendo 1 ou 0.5) até 4, FIC index maior que 4 mostra antagonismo entre os compostos avaliados (HSIEH *et al.*, 1993).

Para o método time-kill, geralmente é considerado sinergismo quando há diminuição de 2 log na contagem de colônias, submetidas à combinação de compostos depois de 24h, comparadas com a contagem de colônias submetidas apenas ao composto que se mostrou mais ativo. Também é considerado que há sinergismo quando essa diminuição de 2 log existe comparada com a contagem de colônias formadas pelo inóculo inicial sem ação de compostos. Indiferença é definida como uma diminuição menor que um log na comparação entre colônias submetidas à ação dos compostos após 24 h com a contagem das colônias nas quais o inóculo foi submetido pelo agente mais ativo. Antagonismo é definido como um aumento de 2 log na contagem comparada, feita como citado anteriormente (LANDERSDORFER *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2010; TÄNGDÉN *et al.*, 2014).

1.7. MODELO *IN VIVO*

Por razões éticas é proibido conduzir testes experimentais primários em humanos, como identificação de virulência de bactérias, avaliação de resposta imune à infecção, avaliação da toxicidade e efetividade de compostos antimicrobianos. Por isso, o estudo de doenças infecciosas requer modelos animais como hospedeiros. O modelo murino *Mus musculus* é o favorito para estudos *in vivo*, devido a sua anatomia, imunologia e da suscetibilidade semelhante a patógenos que murinos e humanos compartilham. A principal desvantagem desse modelo está relacionada com problemas éticos de experimentação em mamíferos. Outros problemas como o longo período de reprodução, a extensa mão de obra para manutenção, e seu alto custo, e o número de ratos necessários para a realização de experimentos (GLAVIS-BLOOM, MUHAMMED, MYLONAKIS, 2011).

1.7.1 Modelos invertebrados

Humanos e invertebrados possuem características evolutivas análogas possibilitando o uso desses como modelo de hospedeiro para estudos *in vivo*. O emprego de espécies como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* confere diversas vantagens em relação aos modelos de mamíferos, razão pela qual, com o passar dos anos e com o aumento das barreiras éticas, seu emprego ter aumentado (KAVANAGH; KAVANAGH; REEVES, 2016). As principais vantagens que esses três modelos compartilham são o baixo custo desses invertebrados, sua fácil manutenção, o seu tamanho reduzido comparado com mamíferos e o seu curto ciclo de vida (GLAVIS-BLOOM, MUHAMMED, MYLONAKIS, 2011). Quando comparamos o sistema imunológico de insetos, como o de *Galleria mellonella*, com o de nematódeos, como o de *Caenorhabditis elegans*, constatamos que esse é mais complexo. O sistema imune inato, principal combatente na resposta a patógenos em mamíferos, possui grande homologia funcional e estrutural com o de insetos. As células da hemolinfa de insetos são capazes de fagocitar micro-organismos e a resposta humoral desses inclui lisozimas e peptídeos antimicrobianos (KAVANAGH; KAVANAGH; REEVES, 2016; RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012). Além das características do sistema imune, existem semelhanças entre células epiteliais do intestino médio de larvas de insetos e células intestinais dos mamíferos. Além disso,

componentes essenciais como adesão celular, resistência a peptídeos antimicrobianos, degradação do tecido e adaptação ao estresse oxidativo parecem ser de extrema importância no processo de infecção em insetos tanto quanto são em humanos (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

1.7.2 *Galleria mellonella*

Estudos têm utilizado larvas de *G. mellonella* como modelo *in vivo* para avaliação de virulência e testes de novos compostos antimicrobianos para bactérias gram negativas multirresistentes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (BENTHALL *et al.*, 2015; KREZDORN; ADAMS; COOTE, 2014)

O modelo invertebrado de *G. mellonella* vive em colmeias e ninhos de abelhas se alimentando de pólen e cera. Por esse motivo, esse invertebrado é considerado uma peste que acomete abelhas. O seu ciclo de vida dura aproximadamente 7 a 8 semanas em temperaturas de 25-28°C. Quando a larva sai do ovo, passa por seis estágios, durante 5-6 semanas. Após isso, a pré-pupa e pupa são formadas, durando 2 semanas, até que se transformem em mariposa adulta. O modelo de *G. mellonella* apresenta vantagens que a destacam como modelo invertebrado para avaliação da ação de patógenos, sendo a mais importante a sua capacidade de sobreviver a 37°C, possibilitando, assim, mimetizar a temperatura do corpo humano (WOJDA, 2016).



Figura 6. Estágios do inseto *G. mellonella* (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

A infecção desse invertebrado é feita quando as larvas atingem medidas de 2 cm e peso de 250 mg. Isso ocorre através da inoculação com seringa hipodérmica de uma quantidade precisa de patógeno ou do composto a ser estudado, geralmente, na última proleg do invertebrado. Além disso, estudos mostraram que esse modelo é suscetível a diferentes patógenos, o que o faz um modelo de hospedeiro ideal para a avaliação dos mecanismos de virulência e de potenciais compostos antibacterianos (GLAVIS-BLOOM, MUHAMMED, MYLONAKIS, 2011). A maior limitação desse modelo é que seu genoma ainda não foi totalmente sequenciado e não foram desenvolvidos métodos que gerem mutantes, portanto não é possível, ainda, saber o que envolvendo a genética desse modelo pode influenciar nos resultados obtidos (GLAVIS-BLOOM, MUHAMMED, MYLONAKIS, 2011; WODJA, 2016).

1.8. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho orbita sobre a questão alarmante do aumento mundial de cepas bacterianas multirresistentes, principalmente enterobactérias produtoras de carbapenemases, limitando as opções terapêuticas disponíveis no mercado. Frente a isso, avaliamos a utilização da combinação de antimicrobianos já disponíveis que, quando utilizados em conjunto, podem promover uma melhora terapêutica ao paciente infectado por esses micro-organismos resistentes. Além disso, avaliamos alguns aspectos sobre o que ocorre dentro de um biofilme macrocolônia. Ao utilizar macrocolônias primária e secundárias pretendíamos apontar que existem diferenças fenotípicas nas bactérias que compõem um biofilme.

1.9. OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização de terapia combinada de antimicrobianos *in vitro* e *in vivo*, utilizando o modelo invertebrado de *Galleria mellonella*, no tratamento de infecções causadas por *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

1.9.2 Objetivos específicos

Realizar o ensaio de biofilme macrocolônias e isolar diferentes regiões da macrocolônia primária produzida por cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

Avaliar a formação de biofilme dos isolados das macrocolônias de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

Avaliar a eficácia, *in vitro*, da monoterapia e da terapia combinada dos antimicrobianos meropenem, polimixina B e rifampicina frente as cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

Determinar a concentração inibitória mínima para a erradicação de biofilme da monoterapia e da terapia combinada dos antimicrobianos meropenem, polimixina B e rifampicina frente às cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

Avaliar a virulência destas cepas multirresistentes em modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

Avaliar a eficácia da monoterapia e da terapia combinada dos antimicrobianos meropenem, polimixina B e rifampicina em modelo *in vivo* de *G. mellonella* previamente inoculadas por cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

AValiação DA TERAPIA COMBIANDA DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MACROCOLÔNIAS DE *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* PRODUTORAS DE NDM-1

Luana Boff, Flávia Brust, Alexandre Macedo

Despite worldwide dissemination of NDM-1 producing strains there is limited data about it concerning its virulence and new routes for treatment. In Brazil, NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) carbapenemases has mostly been reported in *Enterobacter cloacae* complex. In this study, we evaluate biofilm macrocolonies of NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* strains. Our aim was to evaluate the biofilm formation, susceptibility of individual and combined antimicrobials agents and toxicity in *in vivo* *Galleria mellonella* model between primary and secondary macrocolonies. Our findings indicate that there are differences between primary and secondary macrocolonies of NDM-1 producing *E. hormaechei* subsp. *oharae* strains regarding biofilm formation, slightly differences in minimum inhibitory concentration and no differences in minimum biofilm eradication concentration until the concentration tested 512 mg/L. The main finding in this study was that the triple combination therapy of meropenem, rifampicin and polymixyn B had the best *in vitro* synergistic effect and needed a lower concentration of each antimicrobial agent to inhibit bacterial growth between the double combination therapy tested. This data correlate to another studies about triple combination therapy against NDM-1 producing Enterobacteriaceae strains. As far as we know, this is the first report evaluating *in vitro* triple antimicrobial susceptibility and toxicity *in vivo* in NDM-1 producing Enterobacter.

1. INTRODUÇÃO

A emergência e tratamento de bactérias gram-negativas multirresistentes, incluindo enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, representam um dos grandes problemas enfrentados mundialmente, principalmente em ambientes hospitalares (1,2). A disseminação de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras da carbapenemase NDM-1 (New Delhi metallo-b-lactamase) vêm sendo reportada em diferentes partes do mundo, principalmente na Ásia (3,4). A maioria das cepas produtoras de NDM-1 são resistentes aos beta-lactâmicos e

às outras classes de antimicrobianos (5), por isso, a importância da avaliação de novas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por essas cepas multirresistentes. Nesse contexto, a combinação de dois ou mais antimicrobianos tem sido avaliada, afim de que possa ocorrer sinergismo entre esses e uma possível melhora terapêutica para o paciente. Uma das classes mais utilizadas para a combinação é a das polimixinas. Não utilizada por décadas devido a seus efeitos tóxicos, as cepas multirresistentes são, geralmente, susceptíveis a essa classe, o que a torna uma boa escolha para o teste da terapia combinada (6–8). Existem trabalhos que avaliam o uso da terapia combinada frente a cepas multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, porém existem poucos dados relacionados ao gênero *Enterobacter*, considerado parte também, além das citadas anteriormente, do grupo ESKAPE, grupo de patógenos que mais causam doenças nosocomiais nos Estados Unidos da América (9). Sendo assim, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a eficácia da terapia combinada de antimicrobianos, in vitro e no modelo in vivo de *Galleria mellonella* frente a cepas multirresistentes de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cepa bacteriana

A cepa de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtora de NDM-1 (798F) foi cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Essa cepa foi isolada de uma amostra de urina de um paciente hospitalizado no estado do Rio Grande do Sul – Brasil.

2.2. Ensaio de macrocolônias

Primeiramente, as células foram incubadas em caldo LB (Luria Bertani) overnight a 37°C. Após, 3uL dessa cultura foi inoculado em ágar LB contendo Congo Red (40 mg/L) e Coomassie blue (20 mg/L). A placa foi selada com parafilme e incubado a 37°C por 5 dias. Diferentes regiões dessa macrocolônia foram selecionadas para formação de macrocolônias secundárias utilizando o mesmo método descrito acima (10,11).

2.3. Ensaio de formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada pela metodologia de cristal violeta em placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 40 uL de TSB (Tryptone soya broth), 80 uL de água estéril e 80 uL do inóculo bacteriano, e a placa foi incubada a 37°C por 24 h. Após, as células plactônicas foram retiradas lavando a placa três vezes com salina estéril e, posteriormente, a placa foi incubada por 60°C por uma hora para fixar as células ainda ligadas à placa. A placa, então, é corada com cristal violeta 0,4% por 15 minutos em temperatura ambiente e em seguida o biofilme formado na placa de 96 poços é ressuspensionado em 200 uL de etanol por 30 minutos e a absorbância da placa é então lida a 570 nm. (12) Os experimentos foram realizados em triplicata. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 foi utilizado como controle positivo para formação de biofilme. Para análise estatística foi utilizado Student test-t e o software Graphpad Prism 6, $p \leq 0,05$.

2.4. Concentração inibitória mínima (MIC)

A MIC foi determinada por diluição em caldo de acordo com CLSI 2015 (13). Os antimicrobianos foram preparados em caldo Mueller-Hinton (MH) para obter as concentrações de 2 – 256 mg/L para meropenem e rifampicina e 0,25 – 16 mg/L para polimixina B. O método foi feito em placas de 96 poços, cada poço contendo 100 uL do antimicrobiano e 100 uL de inóculo bacteriano (5×10^5 UFC/mL). A placa foi incubada por 24 h a 37°C. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do antimicrobiano a inibir o crescimento da bactéria em questão. Todos os experimentos de MIC foram feitos em triplicata.

2.5. Ensaio concentração mínima para erradicação de biofilme (MBEC)

Para crescimento do biofilme foram utilizados pedaços de acrílico nas dimensões de 2 x 5 x 10 mm, colocados em placas de 96 poços e embebidos em 80 uL de inóculo bacteriano, 80 uL de água estéril e 80 uL de TSB por 24 h a 37°C. Após, os acrílicos foram retirados e colocados em nova placa de 96 poços com 100 uL de antimicrobiano e 100 uL de MH caldo por 18-20 h a 37°C. As concentrações utilizadas para meropenem e rifampicina foram de 512, 256 e 128 mg/L e para polimixina B foram de 512, 256, 128, 64, 32 e 16 mg/L. Posteriormente, os acrílicos foram retirados da placa, lavados três vezes em salina estéril, colocados em eppendorf contendo 1000 uL de salina estéril e agitados em vórtex por 2 minutos para desprender o biofilme aderido ao acrílico. Diluições seriadas a partir desse eppendorf foram realizadas, semeadas em ágar MH e incubadas por 20 h a 37 °C a para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

2.6. Ensaio checkerboard

Ensaio realizado em placa de 96 poços com as seguintes combinações de antibióticos: meropenem + polimixina B, meropenem + rifampicina, rifampicina + polimixina B e rifampicina + meropenem + polimixina B. Em suma o ensaio é feito adicionando 50 uL de um antibiótico em concentrações decrescentes nas colunas da placa de 96 poços e do outro antibiótico em questão em concentrações decrescentes nas linhas da placa. Além disso, adicionou-se 100 uL de inóculo bacteriano de 5×10^5 UFC/mL em cada poço e incuba-se a placa a 37°C por 24 h. A absorbância da placa é lida em 600 nm, além disso, é verificada visualmente. (14)

As concentrações utilizadas nas combinações duplas de antibióticos foram de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0 mg/L para meropenem, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0 mg/L para rifampicina e 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0 para polimixina B. As concentrações utilizadas na combinação tripla foram para meropenem 4, 2, 1, 0,5, 0,25 mg/L, para rifampicina 1, 2, 4 mg/L, e para polimixina B 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/L. Todas as combinações foram realizadas em triplicata e cada placa continha controle de crescimento (MH caldo e inóculo).

FIC é calculado da seguinte maneira: MIC do antimicrobiano combinado / MIC do antimicrobiano sozinho. FICI (Fractional inhibitory concentration index) é a soma dos FIC da combinação. A existência de sinergia nesse ensaio foi considerada como um FICI de < 0.5 , > 0.5 a 4 foi considerado indiferença entre os compostos utilizados em combinação e > 4 foi considerado antagonismo.

2.6. Ensaio de virulência em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*

Larvas com 220 a 260 mg foram selecionadas para esse estudo. Cada grupo testado continha 10 larvas e os inóculos bacterianos testados foram de $4,5 - 5,5 \times 10^5$, $1,7 - 2,2 \times 10^6$, $4,8 - 6 \times 10^6$ e $1 - 1,9 \times 10^7$ UFC/larva. 10 uL do inóculo bacteriano foi injetado usando seringa Hamilton na última proleg direita da larva. Dois grupos de controle foram realizados em todos os experimentos: grupo de larvas não injetadas e grupo de larvas injetadas com 10 uL de PBS (phosphate-buffer saline). Depois de inoculadas, as larvas foram colocadas em placas de Petri que foram seladas e incubadas a 37°C e observadas diariamente quanto a sua sobrevivência, durante 120 h. As larvas foram consideradas mortas quando não foram responsivas ao toque em sua cabeça. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os dados de sobrevivência foram plotados através do método Kaplan-Meier e para comparação entre os grupos e entre o controle e os grupos foi utilizado o teste log-rank.

Todas as análises foram feitas através do software Graphpad Prism 6, sendo significância considerada quando $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Macrocolônia

O método de crescimento de biofilme em ágar LB contendo Congo Red e Comassie blue por 5 dias mostrou zonas morfológicas diferentes, como é possível observar na figura 1A. As zonas morfológicas indicadas em seta na figura 1A foram coletados e para o novo experimento de macrocolônias, mostrado na figura 1B, formando as macrocolônias aqui chamadas de secundárias.

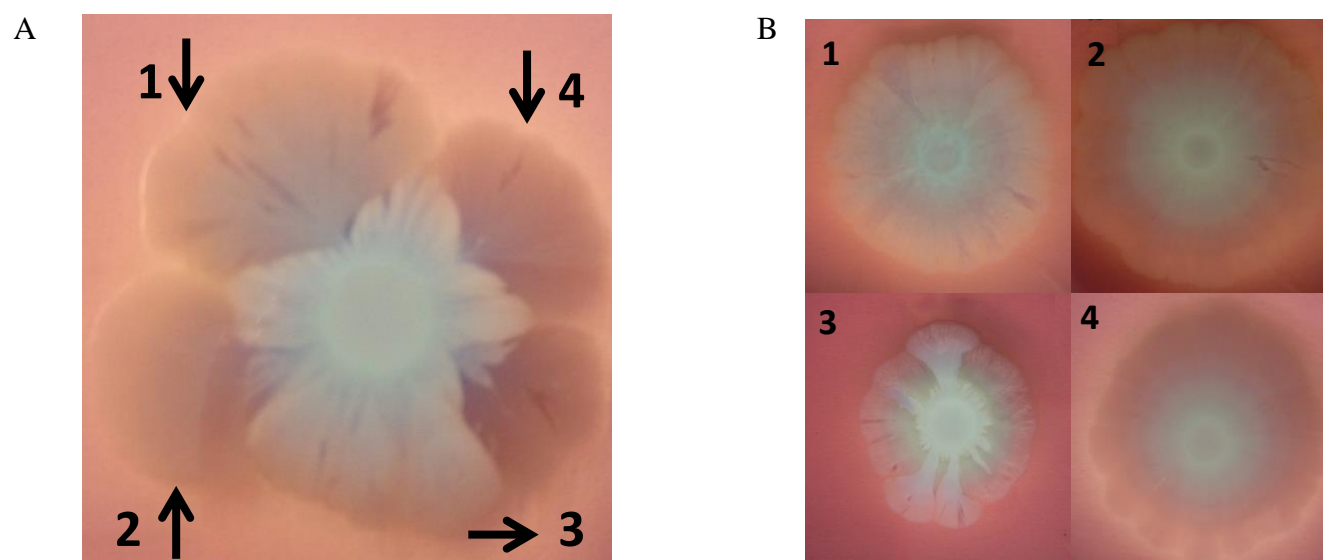


Figura 1. (A) Macrocolônia primária, isolado 798F. Quatro diferentes regiões morfológicas apontadas escolhidas arbitrariamente. (B) Macrocolônias secundárias 798-1, 798-2, 798-3 e 798-4. As quatro regiões na figura 1 foram submetidas a uma nova formação de biofilme em macrocolônia e estão, respectivamente, representadas com seus números, de acordo com a região que foram retirados, na figura 2. Assim, os isolados das macrocolônias secundárias são denominados 798-1, 798-2, 798-3 e 798-4.

3.2. Formação de biofilme

A formação de biofilmes mostrou diferenças entre a macrocolônia primária e as secundárias, como é possível observar no gráfico 1. O biofilme formado pela cepa 798F, macrocolônia primária, foi significativamente maior do que as cepas 798-2, 798-3 e 798-4.

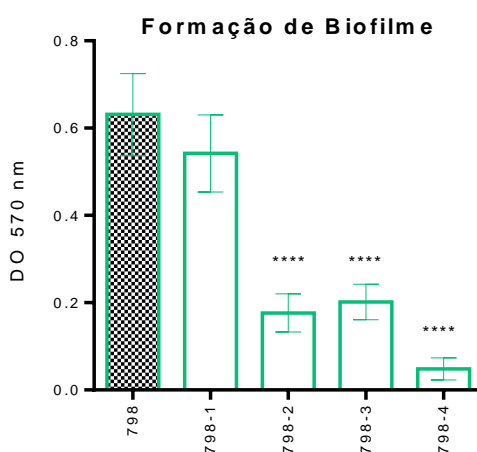


Gráfico 1. Formação de biofilme na colônia primária (área hachurada) e nas colônias secundárias dessa do isolado de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtor de NDM-1. Diferenças significativas na formação de biofilme entre a macrocolônia primária e as secundárias estão marcadas com *, $p < 0,05$.

3.3. Concentração inibitória mínima e concentração mínima para erradicação do biofilme (MBEC)

Segundo EUCAST 2015 (15), susceptibilidade ao meropenem em Enterobacteriaceae se dá quando MIC < 2 mg/L e resistência quando MIC > 8 mg/L, portanto, todos os isolados são resistentes a esse antimicrobiano. Não existem breakpoints para polimixina B e para rifampicina, porém para colistina existe e esse breakpoint será, neste trabalho, considerado para polimixina. Colistina < 2 mg/L é considerado susceptível e > 2 mg/L é considerada resistente.

Os resultados para MIC, exibidos na tabela 1, mostram que para os antimicrobianos meropenem e polimixina B houve diferença entre as macrocolônias primárias e secundárias quanto à concentração necessária para inibição. Para os dois antimicrobianos, a macrocolônia primária apresentou maior MIC. Quanto à rifampicina, todos os

isolados apresentaram a mesma MIC. Para MBEC, observamos que nenhum antimicrobiano utilizado, até a concentração de 512 mg/L, foi capaz de erradicar o biofilme.

Tabela 1. Dados da concentração mínima para erradicação do biofilme, concentração inibitória mínima e checkerboard

Amostra	MBEC (mg/L)			MIC (mg/L)			Checkerboard			
	M	P	R	M	P	R	M/P	M/R	P/R	M/P/R
798F	>512	>512	>512	64	2	128	8/0,5 (S)	2/64 (I)	1/64 (I)	4/0,25/4 (S)
798-1	>512	>512	>512	32	2	128	4/0,5 (S)	2/8 (S)	1/64 (I)	2/0,25/4(S)
798-2	>512	>512	>512	32	1	128	8/0,5 (I)	0,5/64 (I)	1/1 (I)	1/0,25/4 (S)
798-3	>512	>512	>512	16	1	128	4/0,5 (I)	1/64 (I)	0,5/64 (I)	1/0,25/4 (S)
798-4	>512	>512	>512	16	1	128	1/1 (I)	2/64 (I)	0,5/64 (I)	1/0,25/4 (S)

MIC: Concentração inibitória mínima; MBEC: Concentração Mínima para Erradicação do Biofilme; R, Rifampicina; M, Meropenem; P, Polimixina B; S: sinergismo; I: indiferente.

3.4. Checkerboard

A combinação entre rifampicina e meropenem, como mostra a tabela 1, apresentou sinergismo apenas para o isolado 798-1, sendo sinergismo sempre considerado $FICI < 0,5$. A combinação meropenem e polimixina B foi sinérgica para os isolados 79F e 798-1 e indiferente para 798-4. A combinação rifampicina e polimixina B foi indiferente para todos os isolados testados. Rifampicina, meropenem e polimixina B, foi a combinação mais efetiva, mostrando sinergismo para todos os isolados.

3.5. Avaliação da virulência *in vivo*

Foram usados quatro inóculos bacterianos para acessar a virulência dos isolados da macrocolônia de *Enterobacter hormaechei* subsp. *ohare*. O gráfico 2 mostra a porcentagem de sobrevivência das larvas inoculadas, sendo que nenhuma foi estatisticamente diferente do controle (PBS) e nem entre os isolados. Já nos inóculos B, C e D todos os isolados foram estatisticamente diferentes do controle e os isolados que diferiram um quanto ao outro estão demonstrados na tabela 2.

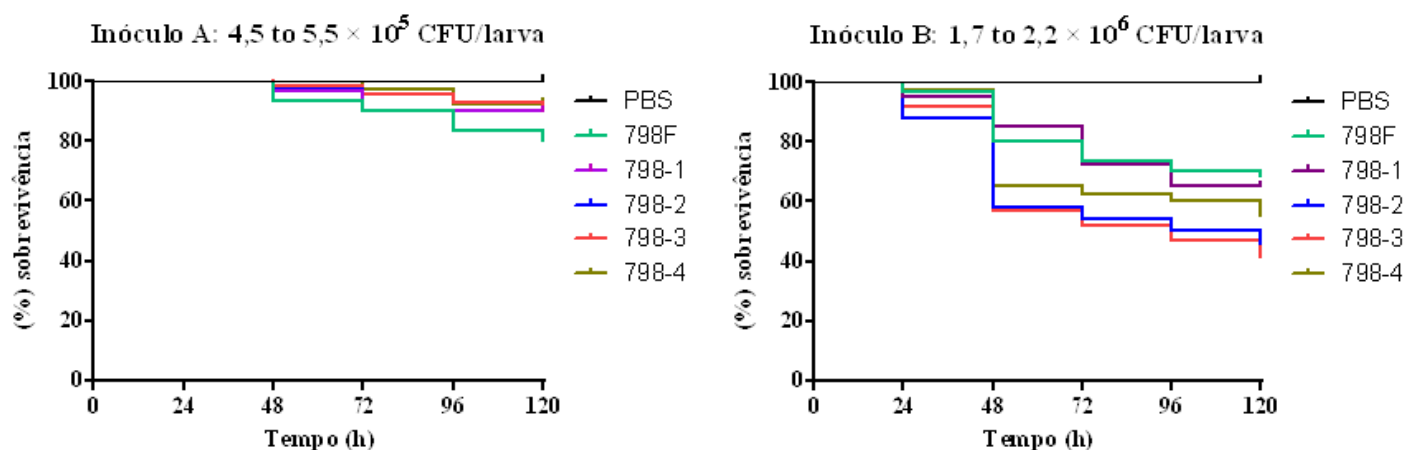


Gráfico 2. Curva de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* inoculadas após 120h de incubação a 37°C. (A) Inóculo A $4,5 - 5,5 \times 10^5$, nenhum isolado foi estatisticamente diferente do controle (PBS). (B) Inóculo B $1,7 - 2,2 \times 10^6$, todos isolados foram estatisticamente diferente do controle (PBS), sendo $p < 0,05$.

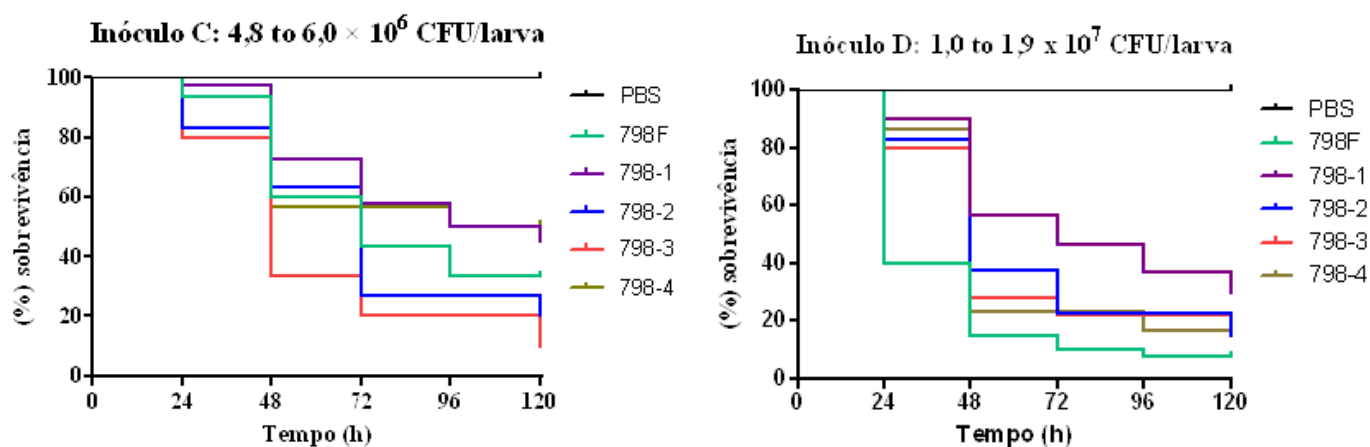


Gráfico 3. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* inoculadas após 120h de incubação a 37°C. (A) Inóculo C $4,8 - 6,0 \times 10^6$, todos isolados foram estatisticamente diferente do controle (PBS). (B) Inóculo D $1,0 - 1,9 \times 10^7$, todos isolados foram estatisticamente diferente do controle (PBS), sendo $p < 0,05$.

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência das macrocolônias em cada inóculo testado.

UFC/larva	PBS	Macrocolônias				
		798F (%)	798-1 (%)	798-2 (%)	798-3 (%)	798-4 (%)
IA: $4.5 - 5.5 \times 10^5$	100	80.0	90.0	90.0	90.0	92.5
IB: $1.7 - 2.2 \times 10^6$	100	68.3 ^{a,b}	65.0 ^b	46.0	41.6	55.0
IC: $4.8 - 6.0 \times 10^6$	100	33.3 ^b	45.0 ^{a,b}	20.0	10.0	50.0 ^{a,b}
ID: $1.1 - 1.9 \times 10^7$	100	7.5	30.0	15.0	20.0	16.7

IA, Inóculo A; IB, Inóculo B; IC, Inóculo C; ID, Inóculo D; Em negrito, isolados mais virulentos nos respectivos inóculos; ^a: isolados menos virulentos que 798-2; ^b: isolados menos virulentos que 798-3; Sendo $p < 0,05$ em todos os casos.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, observou-se que a macrocolônia produzida pelo isolado 798F, uma cepa de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtora da carbapenemase NDM-1, apresentou diferentes regiões morfológicas (capacidade da macrocolônia de gerar mutações do isolado 798F). Estas regiões originaram as macrocolônias secundárias. Com o objetivo de verificar se além dessas diferenças fenotípicas as macrocolônias também apresentavam diferenças genotípicas foram avaliadas a formação de biofilme, MIC e MBEC para meropenem, rifampicina e polimixina B, eficácia da terapia combinada desses antimicrobianos e toxicidade em larvas de *G. mellonella* das macrocolônias primária e secundárias.

O perfil de formação de biofilme dessas foi significativamente diferente, o que nos mostra que, corroborando com Serra et al. 2013, a capacidade das macrocolônias secundárias de formarem biofilmes de forma diferente é atribuído a prováveis mutações que ocorreram dentro do biofilme primário (na macrocolônia primária) das quais as macrocolônias secundárias foram originadas. Sendo assim, podemos concluir que o crescimento do biofilme em macrocolônia representa um bom método para a avaliação dos diferentes morfotipos presentes nesta forma de crescimento, o que é extremamente difícil de ser avaliado por modelos convencionais de formação de biofilme como o modelo de submersão (11).

As concentrações desses antimicrobianos (meropenem, polimixina B e rifampicina) para MBEC foram testadas até 512 mg/L, pois acima disso uma correspondência clínica para sua utilização é inviável. Portanto, nenhum antimicrobiano utilizado sozinho foi capaz de erradicar o biofilme das macrocolônias primária e secundárias de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtor de NDM-1. Como o principal componente da matriz exopolimérica (EPS) do biofilme é o que define suas propriedades físicas (16), talvez esse componente não tenha variado entre os isolados, apesar das prováveis mutações ocorridas, visto que, todos os isolados foram resistentes a uma concentração considerada alta dos antimicrobianos testados. Porém, como o EPS é extremamente complexo, mais estudos são necessários para verificar a diferença entre os componentes desses biofilmes, afim de, elucidar o porquê sua formação varia entre as macrocolônias. Legitimando esse pensamento, nem rifampicina foi capaz de erradicar a 512 mg/L o biofilme dessas Enterobactérias testadas, antimicrobiano utilizado principalmente para infecções por biofilmes.

Combinações terapêuticas que sejam sinérgicas para bactérias multirresistentes geralmente não incluem antimicrobianos aos quais a bactéria é resistente, muito menos antimicrobianos que não possuam espectro para bactérias gram-negativas (3). Meropenem é o antibiótico da classe dos carbapenêmicos, considerados de última instância para tratamento de bactérias gram negativas (13), rifampicina é usado para tratamento infecções por biofilmes (14) e a classe das polimixinas é um antibiótico pouco usado nas últimas décadas e que algumas bactérias multirresistentes ainda são susceptíveis. (8) Esses três antibióticos foram escolhidos pelas características mencionadas para serem avaliados como uma terapia combinada para erradicação de células sésseis das cepas de *E. hormaechei* subsp. *oharae* produtores de NDM-1. A melhor terapia combinada foi dos três antimicrobianos, as MICs desses decaíram significativamente quando usados em conjunto. Ou seja, visando uma terapia clínica, onde um paciente já debilitado e com uma infecção por uma enterobactéria multirresistente não pode receber alta dosagem de antimicrobianos, a utilização de meropenem, rifampicina e polimixina B parece ser uma alternativa promissora. As combinações meropenem e rifampicina e meropenem e polimixina B apresentaram sinergismo para alguns isolados enquanto a combinação de rifampicina com polimixina B foi indiferente para todos isolados testados. Considerando que a Enterobactéria avaliada nesse estudo é também da família Enterobacteriaceae e produtora de NDM-1 nossos resultados corroboram com os dados de Tängdén et. al, 2014, que demonstraram que a combinação de meropenem, rifampicina e colistina foi a melhor para o

tratamento de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM e VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase).

Houve diferenças significativas entre as macrocolônias em três dos quatro inóculos testados, IB, IC e ID no modelo *in vivo* de virulência. Os inóculos IB e IC parecem seguir o mesmo padrão, sendo 798-2 e 798-3 mais virulentas que as demais, como foi mostrado na tabela 2. Curiosamente, no inóculo IC, a macrocolônia primária 798F foi a mais virulenta. Isso talvez possa ser explicado por mecanismos de quórum sensing, que precisariam de uma maior quantidade de bactérias desse isolado 798F para atingir uma alta mortalidade nas larvas. Essa teoria poderia ser testada através de espectrometria de massas, visando moléculas do quórum sensing, porém não foi objetivo desse trabalho testar essa teoria. A virulência desses isolados foi determinada em modelo *in vivo* de *G. mellonella* para posterior análise do tratamento *in vivo* da combinação mais promissora *in vitro* meropenem, rifampicina e polimixina B.

5. REFERÊNCIA

1. 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;56(1):128–32.
2. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3558–62.
3. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck 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;58(3):1757–62.
4. Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Bactericidal activity of multiple combinations of tigecycline and colistin against NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(6):3441–3.
5. Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-

- producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2295–7.
6. Bergen PJ, Bulman ZP, Landersdorfer CB, Smith N, Lenhard JR, Bulitta JB, et al. Optimizing Polymyxin Combinations Against Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther.* 2015;4(4):391–415.
 7. Teo J, Cai Y, Lim T-P, Tan T, Kwa A. Carbapenem Resistance in Gram-Negative Bacteria: The Not-So-Little Problem in the Little Red Dot. *Microorganisms* [Internet]. 2016;4(1):13.
 8. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006;6(9):589–601.
 9. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* [Internet]. 2008;197(8):1079–81.
 10. Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio.* 2013;4(2):1–12.
 11. Serra DO, Hengge R. Stress responses go three dimensional - The spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. Vol. 16, *Environmental Microbiology*. 2014. p. 1455–71.
 12. Trentin DDS, Giordani RB, Zimmer KR, Da Silva AG, Da Silva MV, Correia MTDS, et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;137(1):327–35
 13. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100 - S25. 2015. 240 p.
 14. Wang Y, Bao W, Guo N, Chen H, Cheng W, Jin K, et al. Antimicrobial activity of the imipenem/rifampicin combination against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* grown in planktonic and biofilm cultures. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(12):3015–25.

15. EUCAST. EUCAST [Internet]. EUCAST. 2015.
16. Murugan K, Selvanayagi K, Al-Sohaibani S. Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. *Saudi J Biol Sci.* 2016;23(1):150–9.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os principais aspectos abordados nesse trabalho, biofilmes e terapia combinada de antimicrobianos frente a cepas multirresistentes, são de extrema importância nos dias atuais. Na era que vivemos, onde poucos ou nenhum antimicrobiano disponível é capaz de erradicar o crescimento de certas bactérias, a busca de novas estratégias terapêuticas, como a apresentada nesse estudo é fundamental.

O resultado mais substancial encontrado nos experimentos realizados foi que a combinação dos antimicrobianos meropenem, rifampicina e polimixina B é eficaz para inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* produtoras de NDM-1. Acreditamos ser o primeiro estudo visando o tratamento de bactérias desse gênero produtoras dessa carbapenemase,

As perspectivas desse estudo são o tratamento *in vitro* de biofilmes dessa bactéria, com as combinações terapêuticas também utilizadas no teste de células sésseis, a fim de identificar se a combinação meropenem, rifampicina e polimixina B também é mais eficaz frente ao biofilme de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*. Também pretendemos realizar um ensaio de infecção e tratamento *in vivo* no modelo *Galleria mellonella*. Por fim, um ensaio para verificar a taxa de mutações dessa cepa, com o objetivo de verificar se as macrocolônias secundárias mutam mais que a primária, para que consigamos entender de uma forma mais embasada nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- ALBUR, M. *et al.* Bactericidal activity of multiple combinations of tigecycline and colistin against NDM-1-producing enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 6, p. 3441–3443.
- BAE, S. *et al.* In vitro synergistic activity of antimicrobial agents in combination against clinical isolates of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2016. n. September.
- BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis and function. **Annual review of microbiology**, 2006. v. 60, p. 131–47.
- BENTHALL, G. *et al.* Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. **International journal of antimicrobial agents**, 2015. v. 46, n. 5, p. 538–545.
- BERÇOT, B. *et al.* In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing enterobacteriaceae. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2011. v. 66, n. 10, p. 2295–2297.
- BERGEN, P. J. *et al.* Optimizing polymyxin combinations against resistant gram-negative bacteria. **Infectious diseases and therapy**, 2015. v. 4, n. 4, p. 391–415.
- BHULLAR, K. *et al.* Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **Plos one**, 11 abr. 2012. v. 7, n. 4, p. e34953.
- BRATU, S. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in brooklyn, ny: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin b and other agents. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2005. v. 56, n. 1, p. 128–132.
- BREMMER, D. N. *et al.* Correlation of checkerboard synergy testing with time-kill analysis and clinical outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2016. v. 60, n. 11, p. 6892–6895.
- CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A. *et al.* Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and QNRB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2014. v. 58, n. 4, p. 2475–2476.
- CHEN, L.; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International journal of oral science**, 2011. v. 3, n. 2, p. 66–73.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm

- for antimicrobial therapy. **Nature chemical biology**, 2007. v. 3, n. 9, p. 541–548.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement m100 - s25**. [S.l.]: [s.n.], 2015.
- ELEMAM, A.; RAHIMIAN, J.; DOYMAZ, M. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin b-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of clinical microbiology**, 2010. v. 48, n. 10, p. 3558–3562.
- EUCAST. Eucast. **Eucast**, [S.l.], 2015.
- EUGENE SANDERS, W. E.; SANDERS, C. C. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical microbiology reviews**, 1997. v. 10, n. 2, p. 220–241.
- FARRAR, W. E.; NEWSOME, J. K. Mechanism of synergistic effects of B-lactam antibiotic combinations on gram-negative bacilli. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1973. v. 4, n. 2, p. 109–114.
- GRIMONT, F.; GRIMONT, P. The genus enterobacter. **The prokaryotes**, 2006. p. 197–214.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current opinion in biotechnology**, 2002. v. 13, n. 3, p. 228–233.
- HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Netherlands: **Antonie van leeuwenhoek**, nov. 1998. v. 74, n. 4, p. 199–210.
- HOFFMANN, H. *et al.* Steigerwaltii subsp . nov ., Three new subspecies of clinical importance. **Journal of clinical microbiology**, 2005. v. 43, n. 7, p. 3297–3303.
- HSIEH, M. H. *et al.* Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 1993. v. 16, n. 4, p. 343–349.
- JUMA, N. A.; FORSYTHE, S. J. Biofilm-based healthcare-associated infections. 2015. v. 830, p. 113–121.
- KAVANAGH, K.; KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Kavanaghreeves exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. 2016. n. August 2015.
- KIM, S. M. *et al.* Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of enterobacter cloacae. **Journal of microbiology**, 2012. v. 50, n. 1, p. 175–178.
- KREZDORN, J.; ADAMS, S.; COOTE, P. J. A *Galleria mellonella* infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, 2014. v. 63, n. PART 7, p. 945–955.

- KU, Y. H. *et al.* *In vitro* activity of colistin sulfate against enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. **Journal of microbiology, immunology and infection**, 2015. v. 48, n. 6, p. 699–702.
- LANDERSDORFER, C. B. *et al.* Quantifying subpopulation synergy for antibiotic combinations via mechanism-based modeling and a sequential dosing design. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2013. v. 57, n. 5, p. 2343–2351.
- LARSEN, F. K. *et al.* Richard e. p. winpenny*. 2003. v. 10, n. 1, p. 101–105.
- LEE, C. R. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, 2016. v. 7, n. JUN.
- LI, J. *et al.* Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **The lancet. infectious diseases**, 2006. v. 6, n. 9, p. 589–601.
- LIN, K. H. *et al.* *In vitro* synergistic antimicrobial effect of imipenem and colistin against an isolate of multidrug-resistant enterobacter cloacae. **Journal of microbiology, immunology and infection**, 2010. v. 43, n. 4, p. 317–322.
- LUTGRING, J. D.; LIMBAGO, B. M. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant enterobacteriaceae detection. **Journal of clinical microbiology**, 2016. v. 54, n. 3, p. 529–534.
- MURUGAN, K.; SELVANAYAKI, K.; AL-SOHAIBANI, S. Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. **Saudi journal of biological sciences**, 2016. v. 23, n. 1, p. 150–159.
- PAAUW, A. *et al.* Genomic diversity within the enterobacter cloacae complex. **Plos one**, 2008. v. 3, n. 8.
- PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu.rev.microbiol.**, 2003. v. 57, n. 0066–4227 (Print), p. 677–701.
- PRODUCING, G. O. Review article beyond susceptible and resistant , part iii : treatment of infections. 2016. v. 21, n. 2.
- RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. 2012. n. December, p. 1–7.
- RAND, K. H. *et al.* Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1993. v. 37, n. 3, p. 613–615.
- RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The journal of infectious diseases**, 2008. v. 197, n. 8, p. 1079–1081.

- RIGATTO, M. H. *et al.* Renal failure in patients treated with colistin versus polymyxin b: a multicenter prospective cohort study. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2016. v. 60, n. 4, p. AAC.02634-15.
- RÖMLING, U. *et al.* Microbial biofilm formation: a need to act. **Journal of internal medicine**, 2014. v. 276, n. 2, p. 98–110.
- SAITO, T.; SADOSHIMA, J. Hhs public access. 2016. v. 116, n. 8, p. 1477–1490.
- SERRA, D. O. *et al.* Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. **Mbio**, 2013. v. 4, n. 2, p. 1–12.
- SERRA, D.; HENGGE, R. Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environmental microbiology**.
- SHAPIRO, J. A. Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. **Journal of bacteriology**, 1987. v. 169, n. 1, p. 142–156.
- STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual review of microbiology**, 2002. v. 56, n. October, p. 187–209.
- TÄNGDÉN, T. *et al.* Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2014. v. 58, n. 3, p. 1757–1762.
- TEO, J. *et al.* Carbapenem resistance in gram-negative bacteria: the not-so-little problem in the little red dot. **Microorganisms**, 2016. v. 4, n. 1, p. 13.
- TRENTIN, D. D. S. *et al.* Potential of medicinal plants from the brazilian semi-arid region (caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of ethnopharmacology**, 2011. v. 137, n. 1, p. 327–335.
- WANG, X. *et al.* Increased prevalence of carbapenem resistant enterobacteriaceae in hospital setting due to cross-species transmission of the bla_{NDM-1} element and clonal spread of progenitor resistant strains. **Frontiers in microbiology**, 2015. v. 6, n. MAY, p. 1–8.
- WANG, Y. *et al.* Antimicrobial activity of the imipenem/rifampicin combination against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* grown in planktonic and biofilm cultures. **World journal of microbiology and biotechnology**, 2014. v. 30, n. 12, p. 3015–3025.
- WHITE, R. L. *et al.* Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy : time-kill , checkerboard , and e test . these include : comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy : time-kill , checkerboard , and e test. 1996. v. 40, n. 8, p. 1914–1918.
- WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect science**, 2016.

ZHAO, W. *et al.* Interactions of linezolid and second-line anti-tuberculosis agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo . **International journal of infectious diseases**, 2016. v. 9712, n. 16, p. 31154.

ZOGAJ, X. *et al.* Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, 2003. v. 71, n. 7, p. 4151–8.

ZOWAWI, H. M. *et al.* The emerging threat of multidrug-resistant gram-negative bacteria in urology. **Nature reviews urology**, 2015. v. 12, n. 10, p. 570–584.

ZUSMAN, O. *et al.* Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2013. v. 57, n. 10, p. 5104–5111.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VIRULENCE

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

AUTHORSERVICES
Supporting Taylor & Francis authors

[Click to submit online](#)

About the journal

Virulence is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Preparing your paper

Submission types

Virulence accepts the following types of submissions:

Research Papers/Reports. Research Papers or Reports should include the following sections in the following order:

- **Abstract:** A single paragraph of fewer than 250 words. The primary goal of the abstract should be to make the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract.
- **Introduction.**
- **Results:** Present results in a logical sequence in tables and illustrations. In the text, explain, emphasize or summarize the most important observations. Units of measurement should be expressed in accordance with Systeme International d'Unites (SI Units).
- **Discussion:** Do not repeat in detail data given in the Results section. Emphasize the new and important aspects of the study. Relate observations to other relevant studies. On the basis of your findings (and others'), discuss possible implications/conclusions. When stating a new hypothesis, clearly label it as such.
- **Patients and Methods/Materials and Methods:** Describe the selection of patients or experimental animals, including controls. Do not use patients' names or hospital numbers. Identify methods, apparatus (manufacturer's name and address) and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Provide references and brief descriptions of methods that have been published. When using new methods, evaluate their advantages and limitations. Identify drugs and chemicals, including generic name, dosage and route(s) of administration.
- Indicate whether the procedures were approved by the Ethics Committee of Human Experimentation in your country, or are in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.
- For reagents listed in the Materials and Methods section, the company that supplied the reagent and the catalog number should be listed in parentheses; do not list the company location.
- **References:** No more than 85.

- Figure legends.
 - Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and include descriptive titles and legends.
- Reviews.** Reviews should be recognized as scholarly by specialists in the field being covered, but should also be written with a view to informing readers who are not specialized in that particular field, and should therefore be presented using simple prose. Please avoid excessive jargon and technical detail. Reviews should capture the broad developments and implications of recent work. The opening paragraph should make clear the general thrust of the review and provide a clear sense of why the review is now particularly appropriate. The concluding paragraph should provide the reader with an idea of how the field may develop or future problems to overcome, but should not summarize the article. To ensure that a review is likely to be accessible to as many readers as possible, it may be useful to ask a colleague from another discipline to read the review before submitting it. Submitted reviews are subject to the same page charges as full-length reports—whether and how page charges will apply for commissioned reviews will be determined upon each commission. Reviews should include an abstract of 150 words and should cite no more than 150 references.

Protocols. Protocols describe a powerful experiment, a method or important technical updates relevant to the field. A high priority of *Virulence* Protocols is that all protocols be accessible to nonspecialists, thus the text and figures should be readable and clear to those outside the field. The Protocols section only features proven protocols, thus the authors of the protocol must have previously used their method to produce the work reported in a peer-reviewed primary journal. Generally Protocols are commissioned by the editorial team, but pre-submission inquiries are also welcome. Commissioned protocols will undergo peer review, thus commissioning does not guarantee publication.

Please include the following:

- Title: (should describe the method and, if appropriate, its application).
- Abstract: (~150 words). Should briefly describe the protocol, its applications and the results that can be expected. If possible, include a final sentence indicating how long the whole protocol takes.
- Introduction: Should enable readers to make a decision as to the suitability of the protocol to their experimental problem. You should introduce the technique under discussion and include references to key papers where the protocol has been used previously. This section should include information on (a) the development of the protocol, (b) potential applications of the method, (c) comparison with other methods and (d) experimental design with procedure-specific information.
- Materials: Please use the subheadings (a) Reagents, (b) Equipment, (c) Reagent Setup and (d) Equipment Setup to structure this section. Subheadings (c) and (d) are optional.
 1. Reagents: List of essential reagents, including information about the suppliers. If you have found that deviations from a particular reagent, or its source, have adverse effects on the outcome of the protocol this should be made clear. Toxic or harmful agents should be highlighted, followed by a brief explanation of the hazard and the precautions that should be taken when handling the agent.
 2. Equipment: List essential equipment, highlighting any specialist equipment required.
 3. Reagent Setup: This section is appropriate for including details on required sample specifications (i.e. minimum protein quantity and allowed buffer components), preparation of a complicated buffers, the pre-treatment of solvents and/or reagents to make sure they are moisture-free and/or air-free. Please indicate whether a buffer/solution should be made up fresh or can be stored and, if so, under which conditions and for how long. In addition please state whether % solutions are wt/vol or vol/vol.

4. **Equipment Setup:** This section should contain details on the setup of equipment (i.e. HPLC separation methods).

- **Procedure:** This step by step methodology is the major part of the protocol and must be a numbered list. If the protocol naturally breaks into separate stages, then include subheadings and resume the numbered list. State how long the section will take to complete. Include diagrams and/or photographs of equipment set-up, where appropriate. If the protocol is complicated, you should consider including a flow diagram to demonstrate how the stages fit together. Please include PROBLEM callouts after steps where problems are encountered, that are subsequently mentioned in the Problem Handling section.

Problem Handling section.

- **Timing:** If possible, please include a timeline indicating the approximate time a step, or set of steps, will take. Provide this information as a summary at the end of the procedure.
- **Problem Handling (Problem Tracing, Fault Finding, Fault Diagnosis):** Include information on how to trace and correct the most likely problems users will encounter with the protocol. Please provide this information in the form of a table with the columns 'Step', 'problem', 'possible reason', 'solution'. The step number should be given where the problem is first observed (not where it occurred). The appropriate steps should also be flagged in the main text by the heading 'Problem'. If problem handling text refers to only one or two steps, it can also be formatted as normal text with subheadings referring to the steps or sections that the information pertains to.
- **Anticipated Results:** Include information about the likely outcome for users, for example, likely yield of protein, typical microscopy images, etc. This is a good place to include directions on how to interpret and analyze the raw data, including equations if necessary.

Brief Reports. These are short experimental papers that present unusually interesting data combined with a discussion of what the data might mean, or an explanation of why the data contradicts current paradigms. The primary goal of the abstract should be to make the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership.

The length of a Short Paper should not exceed 15 double-spaced printed manuscript pages of text inclusive of references and exclusive of Figures and Tables.

Short papers should include the following sections:

- Abstract: maximum 150 words
- References: maximum 30

News & Views. News & Views are essentially auto-commentary. The Editorial Board will solicit authors of the most significant recent and forthcoming papers, published elsewhere, to provide a short summary with additional insights, new interpretations or speculation on the relevant topic. The News & Views should not include data, but model figures are acceptable; if you wish to include unpublished data, please use the Brief Report format. The first paragraph will constitute the abstract (50–75 words) and the text is limited to 1,000-3,000 words (not including figure legends, which should be a maximum of 150 words). News & Views will have no references, but the original paper will still be noted on the first page.

Perspectives. Perspectives may be short and focused opinion articles, commentaries on papers recently published in *Virulence* or elsewhere, or commentaries on significant conceptual changes, important trends or new directions in the field. These may include figures and up to 30 references. Please include an abstract of 150-200 words.

Meeting Reports. Meeting Reports are summaries of presentations from recent meetings in the field. Authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief with proposals for meeting reports. Also, please contact the meeting organizers to verify that reports will be permitted. Please include an abstract of 150-200 words.

Editorials. Editorials are short, invited opinion pieces that discuss a paper, a collection of papers or a topic and put it in context for the scientific community. Most editorials are ca. 1,000-1,500 words total and have no abstract.

Letters to the Editor. Letters to the Editor are aimed at publishing short, but important, breakthrough data not embedded within a complex story. This can also be what is considered a Small Publishable Unit. In other words, data that is sufficient in itself to be published, but not a part of a larger story that would comprise an entire research article.

Letters to the Editor can also be mini-reviews with a small addition of novel data. Letters to the editor should not have an abstract. The paper should be structured as a research paper (see above), but without the headings and subheadings. Most Letters to the Editor have three figures and/or tables total. No more than 50 references and no more than 4,500 words altogether.

Formatting and templates

Papers may be submitted in any standard file format, including Word and LaTeX. Figures should be saved separately from the text. The main document should be double-spaced, with one-inch margins on all sides, and all pages should be numbered consecutively. Text should appear in 12-point Times New Roman or other common 12-point font.

Style guidelines

Submissions to *Virulence* should follow the style guidelines described in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (8th ed.). *Merriam-Webster's Collegiate Dictionary* (11th ed.) should be consulted for spelling.

References

References should be presented in a separate section at the end of the document, in accordance with *CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* guidelines. The references should be listed and numbered based on the order of their first citation. Every reference should be assigned its own unique number. References should not be repeated in the list, with each mention given a different reference number, nor should multiple references be combined under a single reference number. Superscripted digits should be used for in-text citations. Superscripted citations should follow periods, commas, closed quotation marks, question marks, and exclamation points. Mention of a specific reference within the course of a sentence should be preceded by "ref." (e.g., "For a review, see ref. 20" or "For reviews, see refs. 20–25").

Author listings in references should be formatted as indicated below.

<i>1 author</i>	Smith A.
<i>2 to 10 authors</i>	Smith A, Jones B, Smythe C, Jonesy D, Smitty E, Jonesi F, Smithe G, Janes H, Smithee I, Junes J.
<i>More than 10 authors</i>	Smith A, Jones B, Smythe C, Jonesy D, Smitty E, Jonesi F, Smithe G, Janes H, Smithee I, Junes J, et al.

Models from US National Library of Medicine (NLM) resources (e.g., *MEDLINE*, *Index Medicus*), *BIOSIS Serial Sources*, and other resources that follow ISO 4 standards should be employed for abbreviating journal titles in the reference section. Examples of common reference types appear below.

<i>Journal article</i>	12. Taylor J, Ogilvie BC. A conceptual model of adaptation to retirement among athletes: a meta-analysis. <i>J Appl Sport Psychol</i> . 1994;6(1):1–20. doi:10.1080/10413209408406462.
<i>Book</i>	2. Duke JA. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton (FL): CRC Press; 2001.
<i>Edited book chapter</i>	34. Gordon S. Career transitions in competitive sport. In: Morris T, Summers J, editors. <i>Sport psychology: theory, applications and issues</i> . Milton (Australia): Wiley; 1995. p. 474–493.
<i>Online/Website</i>	8. United States Census Bureau. American housing survey: 2013 detailed tables . Washington (DC): United States Department of Commerce; 2014 Oct 16 [accessed 2014 Oct 21]. http://www.census.gov/newsroom/press-releases/2014/cb14-tps78.html .
<i>Dissertation/Thesis</i>	26. Allison N. Bacterial degradation of halogenated aliphatic acids [dissertation]. Nottingham (UK): Trent Polytechnic; 1981.
<i>Conference presentation</i>	4. Alfermann D, Gross A. Coping with career termination: it all depends on freedom of choice. Paper presented at: 9th Annual World Congress on Sport Psychology; 1997 Jan 23; Netanya, Israel.
<i>Paper/Report</i>	55. Grigg W, Moran R, Kuang M. National Indian education study. Washington (DC): National Center for Education Statistics; 2010. NCES publication 2010-462.

Checklist: what to include

1. **Author details.** On the title page please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, and email addresses on the cover page. Where appropriate, please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, and email addresses on the cover page. Where appropriate, please also include ORCIDiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the published article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that authorship may not be changed after acceptance. Also, no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. Read more on authorship [here](#).

2. **Abstract.** Please see submission types for word limits. Read tips on [writing your abstract](#).

3. **Keywords.** Keywords are the terms that are most important to the article and should be terms readers may use to search. Authors should provide 5 to 10 keywords. Please read our page about [making your article more discoverable](#) for recommendations on title choice and search engine optimization.

4. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

For single agency grants

This work was supported by the <Funding Agency> under Grant <number xxxx>.

For multiple agency grants

This work was supported by the <Funding Agency #1> under Grant <number xxxx>; <Funding Agency #2> under Grant

5. **Disclosure statement.** With a disclosure statement you acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. Further guidance, please see our page on [what is a conflict of interest and how to disclose it](#).

6. **Supplemental online material.** Please provide supplementary material in the following formats:

- **Text:** MS Word file

- **Table/Data:** MS Word file or Excel file

- **Figures:** Please provide figures in a MS Word file or in a PPT file, clearly labeled with figure legends below them.

- **Video Files:** Video submissions for viewing online should be Audio Video Interleave (.avi), MPEG (.mpg, .mp4), or Quick Time (.qt, .mov).

- AVI files can be displayed via [Windows Media Player](#); MPEG files can be displayed via [Windows Media Player](#); Quick Time files require [Quick Time software](#) (free) from Apple
- Videos should be brief whenever possible (<2-5 minutes). Longer videos will require longer download times and may have difficulty playing online. Videos should be restricted to the most critical aspects of your research. A longer procedure can be restructured as several shorter videos and submitted in that form.
- It is advisable to compress files to use as little bandwidth as possible and to avoid overly long download times. Video files should be no larger than 5 megabytes. This is a suggested maximum. If files are larger, please contact the Managing Editor.
- A caption giving a brief overall description of the video content should be provided for each video.
- If your paper is accepted for publication you may wish to supply the editorial office with several different resolutions of your video files. This will allow viewers with slower connections to download a lower resolution version of your video.

Please also provide ALL files in one PDF file. Links to supplementary data will be included in the PDF of the published manuscript and in the online abstract.

7. **Figures.** Figures should be high quality (600 dpi for black & white art and 300 dpi for color). Figures should be saved as TIFF, PostScript or EPS files. Figures embedded in your text may not be able to be used in final production.

8. **Tables.** Please supply editable table files. We recommend including simple tables at the end of your manuscript, or submitting a separate file with tables.

9. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. Please see our page on [mathematical symbols and equations for more information](#).

10. **SI Units.** Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by commas (1,000). Unusual units or abbreviations should be defined in the legend. Please use the proper microsymbol (denoting a factor of one millionth) rather than a lower case u.

Author agreement / Use of third-party material

Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. As an author you are required to secure permission if you want to reproduce any figure, table or extract text from any other source. This applies to direct reproduction as well as "derivative reproduction" (for which you have created a new figure or table which derives substantially from a copyrighted source). Please see our page on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#) for more guidance. Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become property of the publisher.

Policies

Editorial policies

When a manuscript is submitted, the Editors assume that no similar paper has been or will be submitted for publication elsewhere. Further, it is understood that all authors listed on a manuscript have agreed to its submission.

Manuscripts should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (URMSBJ), which can be found in full at www.icmje.org. This is in addition to their need to conform to our general guidelines about layout, etc. In particular, the attention of authors is drawn to the following conditions (some of which are extracted from the URMSBJ):

Disclosure of interest

Please include your disclosure statement under the subheading "Disclosure of interest." If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflict of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. [Read more on declaring conflicts of interest here.](#)

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrollment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](#). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying with ethics of experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report *in vivo* experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent. All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and safety. Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare](#) and [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioral Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Duplicate or redundant publication

We only publish original manuscripts that are not also published or going to be published elsewhere. Duplicate publications, or redundant publications (re-packaging in different words of data already published by the same authors) will be rejected. If detected after publication, the Editor reserves the right to publish a notice of the fact without requiring the authors' approval. Competing manuscripts on the same study, for example by collaborators who have split into rival teams after the data were gathered, are acceptable only under special circumstances: please contact the Editor-in-Chief for advice.

Limits to freedom of expression

We are committed to academic freedom. It does, however, have to operate within the laws of the USA, where it is published. Although a liberal democracy that is committed to academic freedom, it does have certain legal restrictions on the publication of specific types of material (for example, defamation of character, incitement to racial hatred, material intended to aid terrorism, etc.). In the unlikely event that a manuscript contains material that contravenes these restrictions, the journal reserves the right to request that the material is removed from the manuscript or that the manuscript is withdrawn. In any case, the journal requires authors to take full legal responsibility for what they have written.

Availability of materials and data

It is expected that authors should be able to provide any materials and/or protocols used in published experiments to other qualified researchers for their own use. Materials include (but are not limited to): cells DNA, antibodies, reagents, organisms, mouse strains, and *Drosophila* strains. These should be made available in a timely manner and it is acceptable to request reasonable payment to cover the cost of maintenance and transport.

For materials such as mutant strains and cell lines, authors should use established public repositories and provide relevant accession numbers wherever possible.

Repositories include:

- [Jackson Laboratory \(mouse strains\)](#)
- [Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University \(fly strains\)](#)
- [Drosophila Genomics Resource Center \(DNA clones and cell lines\)](#)

- [MMRRC \(Mutant Mouse Regional Resource Centers\)](#)
- [UK Stem Cell Bank](#)

Papers reporting protein or DNA sequences and molecular structures should provide an accession number to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: "These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345."

General reader feedback and criticisms

Readers are encouraged to submit feedback to the Editor-in-Chief that supports, challenges, and/or elaborates upon previous publications. The Editor-in-Chief may consult with the original authorship of a publication or seek the advice of peer-reviewers to determine an appropriate response in cases where significant errors are noted.

If the feedback is of significant interest, it may be considered for publication as a "Letter to the Editor" at the discretion of the Editor-in-Chief. In these cases, the original authorship of a publication may be given the chance to respond to the feedback in a published "Reply to" or "Response to" article.

Submitting your paper

Virulence uses E-Journal Press to manage the peer-review process. If you have not submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in E-Journal Press. Please read the guidelines above and then submit your paper in the relevant Author Center, where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF). Your manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere.

We recommend that if your manuscript is accepted for publication, you keep a copy of your accepted manuscript. For possible uses of your accepted manuscript, please see our page on [sharing your work](#).

CrossRef Similarity Check

Please note that *Virulence* uses CrossRef Similarity Check™ (Powered by iThenticate) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to the journal you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

Accelerated Track publication

This track is designed to rapidly process manuscripts that were peer-reviewed by leading biomedical journals and either returned to the authors with requests for unreasonable revisions or unjustly rejected. Within this submission track, *Virulence* will consider manuscripts formatted for other journals—no re-formatting is required. The authors should prepare four PDF documents:

1. a complete original manuscript that was rejected by the other journal, with all figures;
2. a complete decision letter from the other journal, with all reviewer's comments;
3. authors' rebuttal letter addressing all the comments by reviewers and editors contained in the decision letter; and
4. a complete revised manuscript that the authors are submitting to *Virulence*, with all figures and tables.

A decision on an Accelerated Track submission is usually made within a few days. The manuscript can be either accepted (as is or with minor revision), rejected, or transferred to the Standard Track. All accelerated track manuscripts should be submitted by email to the Editor-in-Chief emylonakis@Lifespan.org.

Complying with funding agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access (OA) policies. If this applies to you, please ensure that you have included the appropriate funding bodies in your submission's funding details section. You can check various funders' OA policy mandates [here](#) and find out more about [sharing your work here](#).

Accepted Manuscripts Online (AMO)

Manuscripts submitted to the journal are eligible for rapid online posting if a valid copyright form is received and nothing is missing from the paper. The original manuscript will be available on Taylor & Francis Online in a section on the journal's page entitled "Latest Articles." Posted papers will be clearly labeled as the "Accepted, uncorrected manuscript" versions and will include DOI numbers so that the papers can be cited and referenced. Authors will also receive notification from Taylor & Francis when the manuscript is posted, when typeset proofs are available, and once again when the final version is posted. The papers in this section will be removed once the edited and final typeset version is posted online. To ensure rapid publication of the accepted manuscript, we ask you to complete and sign your publishing agreement as quickly as possible.

Proofs

Page proofs are sent to the corresponding author using Taylor & Francis' Central Article Tracking System (CATS). They should be carefully checked and returned within 48 hours.

Cover image submission

Virulence selects a cover illustration from accepted articles, or from submitted images that are designed to accompany an accepted article.

The cover illustration should be scientifically interesting and visually attractive. The illustration need not be a figure from the paper, but should be closely related to the subject of the paper. If you are interested in submitting a figure for use on the cover, please email a high-resolution version of your image, conforming to the specifications below, and an explanatory caption of 50–60 words to the Editor-in-Chief.

All potential cover images should be sized to fit on a single letter size (8.5" x 11") page. Please remove all text, captions, etc. from the image. If you have variations of the image, you may send additional files. Please send no more than two alternate versions.

Accepted formats and resolution:

- PSD (Adobe Photoshop: if graphics are built with layers, do not flatten), 300 dpi, CMYK at 100% size.
- TIF, 300 dpi, CMYK at 100% size
- JPG, 300 dpi highest quality, CMYK at 100% size.
- EPS (scalable vector line art)
- AI (Adobe Illustrator)

Reprints

Authors for whom we receive a valid e-mail address will be provided an opportunity to purchase reprints of individual articles, or copies of the complete print issue. These authors will also be given complimentary access to their final article on Taylor & Francis Online.

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via My Authored Works on Taylor & Francis Online. We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).