

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JÂNIO LEAL BORGES ALVES

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo antimicrobiano
em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Maringá 2015

JÂNIO LEAL BORGES ALVES

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo antimicrobiano em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Bronharo Tognim

Maringá 2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÂNIO LEAL BORGES ALVES

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo antimicrobiano em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Silvana Martins Caparroz Assef
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Dias Siqueira
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 26 de março de 2015.

Local de defesa: Sala 110, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram na jornada do aprimoramento intelectual. Aos professores Alexandre Braoios, e Maria Cristina Bronharo Tognim por grande exemplo de altruísmo e benevolência com todos que passam por seus caminhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que mesmo não merecendo sua força estava sempre ao meu lado me dando força, fé e saúde.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Bronharo Tognim, que me ensinou muito mais do que era de sua obrigação, me orientando, formando como pessoa, dando responsabilidades, tudo aquilo que uma mãe faz por seus filhos. Me mostrando que apesar da vida ser maravilhosa ela não é nada fácil e cabe a cada um de nós correr atrás para melhorá-la.

Aos meus pais Glacy Leal Borges Silva e Jânio Alves da Silva. Tudo que escreveria seria pouco para expressar minha gratidão, mas resumidamente agradeço por me acolherem nos momentos de tristeza, compartilharem meus momentos de felicidade, incentivarem nos momentos de incerteza, me apoiarem nos momentos de aflição e ensinarem princípios cristãos para tentar ser um homem de bem.

A meus irmãos Michell Macedo Alves e Jéssica Leal Borges Alves por me incentivarem, me inspirarem e fazerem parte da nossa maravilhosa família.

A minha namorada Karina, por estar junto comigo me apoiando e incentivando.

Aos meus amigos de mestrado Bruno, Fernanda, Alessandra, Ana Paula, Maisa, Nayara, Priscilla, Nahida, Miriam, Marina, Thaty, Letícia, Juliana, Thais, Kelly, Camila, Aline, Darío, James pelo companheirismo e pelos incontáveis momentos de alegria e descontração.

A Maria, Rosana, Adriana, Lourdes e Vilma por terem me ajudado a concluir o trabalho e me auxiliarem quando foi preciso.

A toda grande família de nosso laboratório.

A Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PCS) que proporcionaram a realização deste trabalho.

A Olívia, secretária do PCS, pela presteza e ajuda sempre que foi solicitada.

EPÍGRAFE

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

“Chico Xavier”

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo entre drogas em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

RESUMO

Introdução: O aumento gradativo da resistência bacteriana e a falta de novos antimicrobianos em desenvolvimento representam um grande desafio à terapêutica de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Neste contexto a associação de antibacterianos tem sido uma alternativa na busca de melhores resultados. A avaliação da ação sinérgica *in vitro* vem sendo avaliada por diferentes metodologias que, de modo geral, são complexas e laboriosas.

Objetivo: O estudo teve como objetivo propor metodologias de fácil execução para detecção de sinergismo antimicrobiano e comparar diferentes métodos já estabelecidos na literatura, testando meropenem, polimixina B e gentamicina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* positivas e negativas para o gene *bla*_{KPC-2}. **Materiais e métodos:** Oito isolados de *K. pneumoniae* foram testados para os métodos padrões de sinergismo: *time-kill curve* (TKC) e *checkerboard* (CB) e para as metodologias propostas de duplo disco (DD) e *time-kill curve* modificado (TKCM) Também foram utilizadas as metodologia de E-test® cruzamento em 90° (C90°), E-test® razão fixa (RF) e disco aproximação (DA) já descritas na literatura.

Resultados: Não houve uma relação direta entre os resultados obtidos nos métodos padrões de TKC e CB. Nenhum dos métodos de E-test mostrou boa correlação com TCK ou com CB, bem como o método de DA. Em relação aos métodos propostos neste estudo, o de melhor correlação tanto com o método TKC e CB, foi o de TKCM com 66,7% e 42,9% de concordância e 90% e 83% de sensibilidade respectivamente. **Conclusão:** Considerando os dados observados neste estudo, nas associações antimicrobianas aqui testadas (i.e. PB+MR, MR+GN e PB+GN), concluímos que as metodologias baseadas em E-test tanto RF quanto C 90°, bem como as metodologias de disco difusão forão ineficazes na detecção do sinergismo. Além disso, verificou-se que o método de TKCM mostrou ser sensível e rápido na detecção do sinergismo podendo ser facilmente implantado em um laboratório de rotina.

Palavras-chave: *checkerboard*, KPC, sinergismo, *time-kill curve*, E-test®, disco-difusão.

Evaluation of different methods in drug synergy detection against KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Introduction: The increase in drug-resistant bacteria and the low development of new antibiotics represent a big challenge of treatment of multiresistant bacterial infections. In this context the antibacterial association has been an alternative in the better search results. The in vitro evaluation of synergistic action has been evaluated by different methodologies that are complex and laborious. **Objective:** The objective of this study was propose easily antimicrobial synergism methods and compare it with different detection methods already established in the literature, using meropenem, gentamicin and polymyxin B against positive and negative isolates of bla_{KPC-2} *Klebsiella pneumoniae*. **Methods:** Eight *K. pneumoniae* strains were tested to the standard synergy methods: time-kill curve (TKC) and checkerboard (CB) and compared to the proposed methodologies double disc (DD) and time-kill curve modified (TKCM) and to the also described in literature E- Test® Cross 90° (C90°), E-Test® fixed ratio (FR) and disk approximation (DA) methods. **Results:** There was not a direct relation between the results obtained by standard methods CB and TKC. None of the E-test e disc methods showed good correlation with TKC or CB. In relation to the proposed methods in this study, the best who correlation with CB and TKC method, was the TKCM with 66.7% and 42.9% agreement and 90% and 83% sensitivity respectively. **Conclusion:** Considering the data observed in this study, the antimicrobial associations tested (PB +MR, PB +GN and GN+MR), we conclude that the methodologies based on E-test® and disk diffusion are ineffective in the detection of synergism. Furthermore, it was found that the TKCM method proved to be sensitive and rapid of synergism detection and can be easily implemented in a routine laboratory.

Keywords: checkerboard, KPC, synergy, time-kill curve, E-test®, disco-difusão.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: International Journal Antimicrobial Agents. Disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-antimicrobial-agents/0924-8579/guide-for-authors>

SUMÁRIO

SUMÁRIO	9
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUÇÃO	11
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	17
Geral.....	17
Específicos	17
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO II.....	21
ABSTRACT.....	23
RESUMO.....	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 Amostras bacterianas.....	25
2.2 Agentes antimicrobianos	26
2.3 Preparo do inóculo bacteriano.....	26
2.4 Teste de suscetibilidade para meropenem, polimixina B e gentamicina:	26
2.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	26
2.4.2 Disco difusão.....	26
2.4.3 E-test®	27
2.5 Testes de sinergismo antimicrobiano	27
2.5.1 Metodologia <i>checkerboard</i>	27
2.5.2 Metodologia time-kill curve.....	27
2.5.3 Método epsilométrico – E-test®	28
2.5.3.1 Cruzamento em 90°	28
2.5.3.2 Razão fixa.....	28
2.5.4 Disco difusão.....	29
2.5.4.1 Disco aproximação:.....	29
2.5.4.2 Disco Duplo.....	29
2.5.5 Metodologia time-kill curve modificado.....	29
2.6 Análises estatísticas.....	30
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO III	45
CONCLUSÕES	45
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
ANEXOS	46

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, encapsuladas e caracterizadas bioquimicamente por fermentadores glicose, utilizarem citrato como fonte de carbono, hidrolisarem uréia e não produzirem ácido sulfídrico. Como membro da família *Enterobacteriaceae*, este gênero é encontrado em locais como água, solo, plantas, esgoto e colonizando o trato gastrointestinal de animais e seres humanos [1].

Klebsiella pneumoniae, a principal espécie do gênero *Klebsiella*, na era pré-antibiótica foi considerada um importante agente causador de infecções comunitárias, porém foi esquecida por longos anos até a década de 70, quando a epidemiologia e a distribuição das infecções bacterianas mudaram drasticamente e a *K. pneumoniae* se estabelecer no ambiente hospitalar, devido sua capacidade de aderir à superfícies e adquirir resistência aos antimicrobianos, causando importantes quadros infecciosos e até mesmo surtos de infecções hospitalares [2].

Os carbapenêmicos são os agentes antimicrobianos mais potentes para o tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas, porque possuem amplo espectro de atividade e são resistentes a hidrólise pela maioria das β -lactamases, incluindo as beta lactamases de espectro estendido (do inglês *extended spectrum beta lactamase* ESBL) Estas propriedades conduziram a um aumento na utilização desses antibacterianos, especialmente nos hospitais onde existe alta prevalência de ESBL. Entretanto, grande preocupação tem surgido uma vez que cepas resistentes aos carbapenêmicos têm sido cada vez mais descritas em todo o mundo [3;4].

A resistência antimicrobiana apresentada por essa bactéria se tornou um problema de saúde pública, principalmente após o surgimento da *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), enzima beta-lactamase descoberta na Carolina do Norte - EUA no ano de 1996 e capaz de hidrolisar os efetivamente os carbapenêmicos [5;6].

Predominantemente observadas em bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp.*, e também em bactérias não fermentadoras de glicose como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*, a enzima KPC proporciona ao

microrganismo alta resistência às penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos [7;8].

Novos estudos vêm demonstrando que a grande parte dos isolados produtores de KPC também são resistentes às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, além disso estes estudos relatam altas taxas de resistência para outros antimicrobianos, clinicamente menos importantes, como nitrofurantoína e cloranfenicol [9;10].

As infecções associadas à bactérias multidroga resistente (MDR) são predominantemente hospitalares, afetam preferencialmente pacientes com: imunocomprometimento, antibióticoterapia prolongadas, ventilação mecânica, doença pulmonar obstrutiva crônica, queimaduras, entre outros [7;8].

O plasmídeo carreador do gene KPC também pode carrear sequências de resistência a vários outros antimicrobianos, mantendo sensibilidade *in vitro* apenas às polimixinas, tigeciclina e fosfomicina [6].

A presença de KPC foi reportada inicialmente em 2001 em uma amostra de *K. pneumoniae* e em 2006 já era encontrada em todo o território americano, além dos países Israel, Grécia, Brasil, China, estando disseminada atualmente em todos os continentes [11-14].

Em relação à classificação molecular das beta-lactamases proposta por Ambler e colaboradores, a KPC é classificada como pertencente à classe A descrita inicialmente como KPC-1 e reclassificada posteriormente como idêntica a KPC-2 [15].

O gene de resistência da KPC é transmitido via plasmidial associados ou não à presença de elementos móveis (transposons), que contribui muito para a sua presença em diferentes bactérias Gram negativas em diversos países e continentes, agravando sua problemática. A KPC-2 e KPC-3 são as variantes mais disseminadas, sendo KPC-22 a última variante descrita até o momento (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp>) [16;17].

As bactérias MDR têm aumentado nos últimos anos, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, tornando-se um grande desafio à saúde pública devido ao reduzido arsenal de opções para o tratamento destas infecções, além de frequentes falhas terapêuticas, graves infecções e elevadas taxas de mortalidade [18;19].

Infecções associadas às bactérias produtoras de carbapenemases e B-lactamases de espectro ampliado (ESBL) estão disseminadas pelo mundo e mesmo com políticas rigorosas de controle de infecção, provaram ser de difícil eliminação, pois possuem capacidade de colonizar indivíduos facilitando sua propagação e manutenção [20].

O problema do aumento da resistência bacteriana, é considerado ainda mais grave, pois o desenvolvimento de novos antibióticos está em queda pela indústria farmacêutica, devido: 1) à dificuldade técnica na obtenção de fármacos antibacterianos estáveis diante dos diferentes mecanismos de resistência apresentados pelas bactérias, 2) à crescente e constante mudança na regulamentação e no licenciamento de produtos de uso terapêutico e, 3) à menores lucros na produção de antimicrobianos quando comparados a produção de fármacos para o tratamento de doenças crônicas [21;22].

Devido a inexistência de novas classes de agentes antimicrobianos com atividade contra bactérias produtoras de KPC, estudos sugerem o uso de altas doses de carbapenêmicos em infusão contínua, embora faltem evidências claras para sustentar este procedimento [4;5].

As opções terapêuticas para bactérias MDR ainda não estão bem definidas. Existem sugestões preliminares enquanto se procede à análises retrospectivas das respostas terapêuticas. As polimixinas são os fármacos mais eficazes contra essas bactérias, no entanto seu uso tem sido limitado devido à suas propriedades farmacocinéticas e/ou toxicidade. Em virtude do rápido surgimento de cepas resistentes a estes fármacos em todo o mundo, sua aplicação não é recomendada em esquemas de monoterapia, sendo a combinação de drogas uma opção terapêutica atrativa [7;9].

Dentre os benefícios das associações de antimicrobianos está uma maior cobertura terapêutica, a possibilidade de minimizar o surgimento de resistência antimicrobiana e a obtenção de interação sinérgica entre os fármacos [23;24].

O sinergismo é definido como um aumento da atividade dos fármacos combinados uma vez comparados aos seus efeitos quando tratados em esquema de monoterapia [25].

Estudos demonstram que a monoterapia no tratamento de bactérias MDR, seja estas com polimixinas ou carbapenens está associada a maiores taxas de mortalidade e falha terapêutica quando comparada à terapia de associação antimicrobiana. Outros autores também relatam que a sobrevida dos pacientes é maior quando a terapia combinada é utilizada em comparação à monoterapia, independente se o microrganismo é sensível a um dos agentes [26].

A terapia sinérgica também tem como finalidade permitir a administração de menores doses de cada antibiótico reduzindo a toxicidade. Além do efeito sinérgico, a combinação entre drogas pode resultar também em efeito aditivo ou antagônico. Essas possibilidades devem ser investigadas para que seja otimizada até mesmo o tratamento empírico de infecções por bactérias MDR. Diante desse fato, a pesquisa e desenvolvimento de técnicas para avaliação do sinergismo entre antimicrobianos se mostra pertinente [27].

O desenvolvimento de métodos para determinação de atividade sinérgica *in vitro*, tem sido objetivo de pesquisadores há algum tempo. Vários métodos foram descritos, entretanto, o método *checkerboard* (CB) e a curva de morte (do inglês – *time-kill curve*– TKC) estão bem padronizados e são amplamente utilizados. Contudo, são metodologias complexas, de difícil aplicabilidade na rotina laboratorial [28].

A metodologia CB utilizada para avaliar a combinação *in vitro* de antimicrobianos é realizada em placas de microdilução contendo 96 poços distribuídos em dois eixos: das abcissas onde os poços são distribuídos de 1 a 11 e o eixo das ordenadas distribuídos de A a H. Um dos antibióticos usados para o teste é diluído na própria placa ao longo de um eixo e o segundo antibiótico é diluído em tubos e adicionado no eixo subsequente. O método forma múltiplas diluições dos antimicrobianos testados em concentrações iguais, acima e abaixo da concentração inibitória mínima (do inglês *minimal inhibitory concentration* – MIC) dos microrganismos testados. Ao final da combinação, os 96 poços possuirão diferentes concentrações de cada um dos antibióticos testados com um mesmo volume final [25].

As diluições dos antimicrobianos são realizadas normalmente em caldo de Mueller-Hinton (MHB) ou um meio de cultura adequado para o estudo bacteriano. Para obtenção do inóculo final (6×10^5) a suspensão bacteriana correspondente à escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$) é feita com ajuda de um nefelômetro em salina a 0,85% e posteriormente diluída em MHB cátion ajustado [25;29;30].

O resultado pode ser considerado sinérgico, antagônico ou indiferente através do cálculo da somatória do índice da fração inibitória onde $(\sum IFI = MICA+B/MICA+MICB+A/MICB)$ os resultados menores ou iguais à que 0,5 são considerados sinérgicos; entre 0,6 e 3,9 indiferentes e maior ou igual à 4,0 são antagônicos. As vantagens deste método é que é possível testar várias combinações de diferentes concentrações de dois antimicrobianos para uma mesma amostra, além de utilizar pequenas quantidades (volume) de cada fármaco testado. A limitação é que este método só determina a atividade inibitória e não a atividade bactericida da combinação [25].

No método TKC, uma suspensão de células bacterianas padronizadas é exposta a uma concentração sub inibitória dos antimicrobianos isoladamente e em combinações. Essas culturas são mantidas em temperatura e aeração adequadas para o crescimento do microrganismo teste; e em tempos pré-determinados, são retiradas alíquotas, que após diluições, são semeadas em meio de cultura sem antimicrobianos [25;29].

As placas são então incubadas, e após o tempo de crescimento, é realizada a contagem de colônias bacterianas, cujos valores são expressos em Log das unidades formadoras de

colônias por mililitros (Log UFC/mL) Esses valores são tabelados em gráficos para melhor observação da diferença do crescimento bacteriano entre os antimicrobianos e associações testadas. Além disso, proporciona uma visão dinâmica da ação antimicrobiana e o tempo de interação (com base na contagem de colônias). Diferentemente deste processo, o CB fornece apenas dados da MIC da associação de antimicrobianos e a verificação do resultado é examinada apenas uma vez, entre 16 a 24h [25;29].

O critério de classificação para atividade sinérgica na metodologia de TKC será determinado de acordo com Pillai et al. (2005) o decréscimo de $\geq 99,9\%$ de microrganismos viáveis da cultura contendo a combinação de drogas em relação à cultura tratada com o agente mais eficaz em 24 horas será definido como sinergismo [25].

Métodos mais práticos que utilizam a interação antimicrobianas de fitas epsilométricas e suas variações têm sido descritos, são considerados os métodos mais recentes para avaliar sinergismo entre antibióticos. Estas metodologias são relativamente semelhantes aos testes de disco-difusão por utilizarem inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (i.e. escala 0,5 de Mcfarland), placas com ágar Muller-Hinton e ainda dependerem de uma boa difusão do antimicrobiano. Estes métodos além de dispendiosos são menos sensíveis que os métodos CB e TKA [31].

O método epsilométrico da interação das MICs por um ângulo de 90° (do inglês – 90° *angle method* ou *Cross*) consiste em sobrepor, de forma cruzada, fitas plásticas impregnadas com uma concentração gradiente de antimicrobianos (i.e. tiras de E-Test), na superfície de uma placa de ágar Muller-Hinton, previamente inoculada com a bactéria testada, e incubada segundo parâmetros *do Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI* para o método de disco-difusão. O cruzamento das fitas se realiza especificamente considerando a MIC previamente estabelecida. A leitura das MICs combinadas é feita na zona de intersecção dos antibióticos) [31-33].

Outro método epsilométrico com a sobreposição direta (do inglês *direct overlay* ou *fixed ratio method*) consiste em difundir a primeira fita da combinação em MHA durante 1 hora à temperatura ambiente, retirar a mesma e, no mesmo local, colocar a segunda fita, lembrando de guardar a primeira para realizar a leitura do FIC da droga retirada. Este método é relativamente diferente dos demais por não depender da obtenção da MIC obtida na fita de E-test para ser realizado, pois a detecção da MIC é feita junto com o método de detecção do sinergismo. Tornando o método mais rápido, mais barato e mais simples para obtenção do resultado [31-33].

O terceiro e último método de interação sinérgica entre as fitas epsilométricas é o de MIC:MIC razão fixa (do inglês MIC:MIC ou *ratio method*) Este método é similar ao de sobreposição direta, porém a sobreposição da segunda fita é ajustada para que a MIC das fitas se sobreponham. Para isso é necessário conhecer a MIC do microrganismo para ambos os antibióticos a serem testados, perdendo a vantagem da mais rápida execução do método da sobreposição direta e ganhando a difusão em local similar a fita anterior não observada no método de cruzamento em 90° [31-33].

O uso de discos de antimicrobianos também tem sido proposto para testar a atividade sinérgica entre drogas, avaliando qualitativamente a interação entre os antibióticos que se difundem em placas de ágar Mueller Hinton inoculados com o microrganismo teste, e tem a vantagem de poder ser utilizado na rotina clínica, por ser de baixo custo e fácil metodologia [34;35].

Este método baseia-se na difusão conjunta de antimicrobianos de modo a observar zonas sinérgicas por distorção do halo de crescimento bacteriano. Os discos são dispostos a uma distância igual ou superior do halo de inibição dos fármacos quando testados sozinhos. A interação entre os discos contendo antimicrobianos é analisada após 16 à 18 horas de incubação em estufa à 35°C. O efeito antagonico no teste de disco é usualmente conhecido pela distorção do halo na interface das duas zonas [34;35].

Encontrar atividade sinérgica de antimicrobianos contra um determinado microrganismo é de suma importância, uma vez que estudos relatam que o início rápido e apropriado da terapia antimicrobiana muitas vezes é o único e mais eficaz fator capaz de reduzir a mortalidade. Sendo assim a descoberta de métodos rápidos para tal detecção também seria de extrema importância [36;37].

JUSTIFICATIVA

O aumento da disseminação de bactérias produtoras de KPC associado à falta de opções terapêuticas, tornou-se um problema de saúde pública em hospitais de todo o mundo. A falta de perspectivas concretas sobre o lançamento de novos antibióticos para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias, faz com que seja necessário a busca de novas opções terapêuticas para o combate eficaz destes agentes infecciosos. A combinação de antimicrobianos tem sido proposta com o objetivo de ampliar o espectro antimicrobiano e diminuir as falhas terapêuticas, em busca de um efeito antimicrobiano sinérgico. As técnicas

padronizadas para pesquisa desse efeito sinérgico são de difícil execução e não se aplicam a rotina de laboratórios.

Diante desse fato, a pesquisa de novas técnicas para avaliação do sinergismo entre antimicrobianos de uso clínico se mostra pertinente, podendo contribuir principalmente junto a equipe médica, auxiliando na terapia de infecções por estes microrganismos.

OBJETIVOS

Geral

O presente estudo teve como objetivo propor metodologias de fácil execução e comparar diferentes métodos já estabelecidos na literatura para utilizando-se meropenem, polimixina B e gentamicina contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* positivos e negativos para o gene *bla*_{KPC-2}.

Específicos

Selecionar amostras de *Klebsiella pneumoniae* positivas e negativas para o gene *bla*_{KPC-2}.

Determinar a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo e E-test® das amostras de *Klebsiella pneumoniae* para Polimixina B, Gentamicina e Meropenem.

Determinar o halo de inibição pelo método de disco-difusão das amostras de *Klebsiella pneumoniae* para Polimixina B, Gentamicina e Meropenem.

Avaliar e comparar as metodologias do estudo com as metodologias padrões *time-kill curve* e *chequerboard*.

REFERÊNCIAS

- [1] Podschum R.; Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.*, n.11, p.589 - 603, 1998.
- [2] Desimoni, MC, ES Quivel GP, Merino LA. Fecal colonization by extended -pectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.v.22, n.9, p.507-11, 2004.
- [3] Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:455-78.
- [4] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007 Jul;20(3):440-58, table.
- [5] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Apr;45(4):1151-61.
- [6] Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014 Oct 7.
- [7] Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012;11:32.
- [8] da Silva RM, Traebert J, Galato D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opin Biol Ther* 2012 Jun;12(6):663-71.
- [9] Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012 Oct;25(4):682-707.
- [10] Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014 Sep;20(9):821-30.
- [11] Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006 Dec;56(4):367-72.
- [12] Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Aug;51(8):3026-9.

- [13] Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Aug;50(8):2880-2.
- [14] Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Feb;52(2):796-7.
- [15] Tzouvelekis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, et al. KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Oct;57(10):5144-6.
- [16] Beirao EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira FH, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011 Jan;15(1):69-73.
- [17] Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy* 2012 May;32(5):399-407.
- [18] Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* 1999 Sep;33(9):960-7.
- [19] Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010 Jun;65(6):1119-25.
- [20] Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- [21] Norrby R et al. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis* 2005;5:115-119.
- [22] Wise R. The drugs industry and the need for new antimicrobials. *Lancet* 2006;367:27.
- [23] Zusman O, Avni T, Leibovici L, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Oct;57(10):5104-11.
- [24] Lim TP, Lee W, Tan TY, et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. *PLoS One* 2011;6(12):e28177.
- [25] Pillai SK, Eliopolous GM; Moellering RC (2005). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5rd edn, (Lorian, V., Ed.), pp. 366–425. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- [26] Chow JW, Yu VL. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. *Int J Antimicrob Agents* 1999 Jan;11(1):7-12.

- [27] Mackay ML, Milne K, Gould IM. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int J Antimicrob Agents* 2000 Jul;15(2):125-9.
- [28] Grzybowska W, Banaszczyk-Rus M, Wojcik A, Tyski S. [Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined]. *Med Dosw Mikrobiol* 2004;56(4):391-403.
- [29] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*; Ninth edition. M07-A9. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- [30] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; Twenty-third informational supplement. M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.
- [31] Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest((R)) methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 Nov;77(3):220-6.
- [32] White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Aug;40(8):1914-8.
- [33] Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003 Jan;22(1):28-34.
- [34] Hofer B, Dantier C, Gebhardt K, Desarbre E, Schmitt-Hoffmann A, Page MG. Combined effects of the siderophore monosulfactam BAL30072 and carbapenems on multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 2013 May;68(5):1120-9.
- [35] Perichon B, Courvalin P. Synergism between beta-lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the vanA operon. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Nov;50(11):3622-30.
- [35] Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro AL, Goncalves AL, Goldani LZ, Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care*, 10: R114, 2006a.
- [35] Zavascki AP, Barth AL, Goncalves AL, Moro AL, Fernandes JF, Martins AF, Ramos F, Goldani LZ,. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58: 387-92, 2006b

CAPÍTULO II

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo antimicrobiano em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Title

Avaliação de diferentes métodos para detecção de sinergismo antimicrobiano em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2.

Authors

Janio Leal Boges Alves¹, Thatiany Cevallos Menegucci¹, Bruno Buranello Costa¹, Letícia Busato Migliorini¹Costa, James Albiero¹, Ana Cristina Gales², Maria Cristina Bronharo Tognim^{1*}

Institution

¹*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.* ²*Laboratório ALERTA, Departamento de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil*

*** Corresponding author**

Address: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-PR, Brazil. Tel.: +55 (44) 3011.4952. Fax: +55 (44) 3011.5941. E-mail: mcbtognim@uem.br

ABSTRACT

Introduction: The increase *in* drug-resistant bacteria and the low development of new antibiotics represent a big challenge of treatment of multiresistant bacterial infections. In this context the antibacterial association has been an alternative in the better search results. The *in vitro* evaluation of synergistic action has been evaluated by different methodologies that are complex and laborious. **Objective:** The objective of this study was propose easily antimicrobial synergism methods and compare it with different detection methods already established in the literature, using meropenem, gentamicin and polymyxin B against positive and negative isolates of bla_{KPC-2} *Klebsiella pneumoniae*. **Methods:** Eight *K. pneumoniae* strains were tested to the standard synergy methods: time-kill curve (TKC) and checkerboard (CB) and compared to the proposed methodologies double disc (DD) and time-kill curve modified (TKCM) and to the also described in literature E- Test® Cross 90° (C90°), E-test® fixed ratio (FR) and disk approximation (DA) methods. **Results:** There was not a direct relation between the results obtained by standard methods CB and TKC. None of the E-test® e disc methods showed good correlation with TKC or CB. In relation to the proposed methods in this study, the best who correlation with CB and TKC method, was the TKCM with 66.7% and 42.9% agreement and 90% and 83% sensitivity respectively. **Conclusion:** Considering the data observed in this study, the antimicrobial associations tested (PB+MR, PB+GN and GN+MR), we conclude that the methodologies based on E-test® and disk diffusion are ineffective in the detection of synergism. Furthermore, it was found that the TKCM method proved to be sensitive and rapid of synergism detection and can be easily implemented in a routine laboratory.

Keywords: checkerboard, KPC, synergism, time-kill curve.

RESUMO

Introdução: O aumento gradativo da resistência bacteriana e a falta de novos antimicrobianos em desenvolvimento representam um grande desafio à terapêutica de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Neste contexto a associação de antibacterianos tem sido uma alternativa na busca de melhores resultados. A avaliação da ação sinérgica *in vitro* vem sendo avaliada por diferentes metodologias que, de modo geral, são complexas e laboriosas. **Objetivo:** O estudo teve como objetivo propor metodologias de fácil execução para detecção de sinergismo antimicrobiano e comparar diferentes métodos já estabelecidos na literatura,

utilizando-se meropenem (MR), polimixina B (PB) e gentamicina (GN) contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* positivas e negativas para o gene *bla*_{KPC-2}. **Materiais e métodos:** Oito isolados de *K. pneumoniae* foram testados para os métodos padrões de sinergismo: *time-kill curve* (TKC) e *checkerboard* (CB) os resultados foram comparados com as metodologias propostas de disco duplo (DD) e *time-kill curve* modificado (TKCM). Também foram utilizadas as metodologias de E-test® cruzamento em 90° (C90°), E-test® razão fixa (RF) e disco aproximação (DA) já descritas na literatura. **Resultados:** Não houve uma relação direta entre os resultados obtidos nos métodos padrões de CB e TKC. Nenhum dos métodos de E-test® mostrou boa correlação com TCK ou com CB, bem como o método de DA. Em relação aos métodos propostos neste estudo, o de melhor correlação tanto com o método TKC e CB, foi o de TKCM com 66,7% e 42,9% de concordância e 90% e 83% de sensibilidade respectivamente. **Conclusão:** Considerando os dados observados neste estudo, nas associações antimicrobianas aqui testadas (i.e. PB+MR, MR+GN e PB+GN), concluímos que as metodologias baseadas em E-test® tanto RF quanto C 90°, bem como as metodologias de disco difusão são ineficazes na detecção do sinergismo. Além disso, verificou-se que o método de TKCM mostrou ser sensível e rápido na detecção do sinergismo podendo ser facilmente implantado em um laboratório de rotina.

Palavras-chave: *checkerboard*, KPC, sinergismo, *time-kill curve*, E-test®, disco-difusão.

1. INTRODUÇÃO

O aumento gradativo da resistência bacteriana e a falta do desenvolvimento de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica representam um grande desafio para a saúde pública [1;2].

As opções terapêuticas para infecções causadas por bactérias multirresistentes são escassas e antimicrobianos mais recentes como tigeciclina, e drogas antigas como fosfomicina e as polimixinas têm sido indicadas. Contudo, limitações devido suas propriedades farmacocinéticas ou toxicidade são encontradas. Em virtude do rápido surgimento de resistência durante o tratamento com estes fármacos, sua aplicação não tem sido recomendada em esquemas de monoterapia, sendo a terapia combinada uma opção atrativa [3;4].

Dentre os benefícios das associações sinérgicas de antimicrobianos estão uma maior cobertura terapêutica, a possibilidade de minimizar o surgimento de resistência e o sucesso na

erradicação bacteriana. Assim o desenvolvimento de métodos para determinação de atividade sinérgica *in vitro*, se mostra pertinente e tem sido objetivo de pesquisadores [3;5].

Vários métodos de sinergismo são descritos, o método *checkerboard* (CB) e *time-kill curve* (TKC) estão bem padronizados e são mais utilizados, porém são metodologias complexas, com difícil aplicabilidade em rotinas laboratoriais [6;7]. Outros métodos mais práticos e rápidos, com o intuito de serem aplicados na rotina têm sido descritos, como os métodos de sinergismo utilizando fitas E-test® e métodos com disco-difusão, porém estes métodos são menos sensíveis se comparados com os métodos CB e TKA [8;9].

O início rápido e apropriado da terapia antimicrobiana muitas vezes é o único e mais eficaz fator capaz de reduzir a mortalidade, desta forma a verificação da atividade sinérgica entre fármacos de maneira rápida e eficaz se torna crucial [10;11].

Portanto, o estudo teve como objetivo propor e avaliar metodologias de fácil execução para detecção de sinergismo antimicrobiano e comparar diferentes métodos já estabelecidos na literatura utilizando meropenem, polimixina B e gentamicina contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* positivos e negativos para o gene *bla*_{KPC-2}.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras bacterianas

Foram selecionados para o estudo 8 amostras de *Klebsiella pneumoniae* pertencentes a diferentes clones, sendo 5 produtoras de *bla*_{KPC-2} e 3 não produtoras. O critério utilizado para a diferenciação genética dos isolados não produtores de KPC foi uma diferença >0,8 em relação ao coeficiente de DICE quando as amostras foram tipadas pela metodologia *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) [12]. Para os 5 isolados que eram produtores de KPC-02, a diferenciação genética foi realizada pela metodologia de *multilocus sequence typing* (MLST) [13;14] realizada no laboratório ALERTA da Universidade Federal de São Paulo e que foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Ana Cristina Gales. As características dos isolados estão descritas na Tabela I. Outros critérios para inclusão das amostras, além da clonalidade, foram presença e ausência de KPC-02 e diferenças nas concentrações inibitórias mínima (do inglês – *minimal inhibitory concentration* - MIC) para carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixina B. Todas as amostras ficaram estocadas em MHB (*Caldo Mueller-Hinton* - Difco Laboratories, Sparks, Md, USA) adicionado de glicerol 30% em freezer a -20°C. Para a realização dos testes, as amostras eram

reativadas, sendo repicadas em placas de Petri em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA) ou *Mueller Hinton Agar* (MHA), por dois repiques consecutivos.

2.2 Agentes antimicrobianos

Foram utilizados 3 antimicrobianos, meropenem (AztraZeneca Wilmington, DE, USA), polimixina B (Inlab, São Paulo, Brasil) e gentamicina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Estes sais foram testados em diferentes metodologias e avaliados puros ou em associações. Para alguns testes os referidos antimicrobianos estavam na forma discos (Oxoid, UK) ou fitas (bioMérieux, Inc). As diferentes metodologias estão descritas a seguir:

2.3 Preparo do inóculo bacteriano

O inóculo bacteriano foi preparado em MHB com o microrganismo em fase logarítmica de crescimento, e padronizado à 0,5 da escala de McFarland (em nefelômetro BD phenix) para a obtenção de uma concentração de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro (UFC/mL). Para as avaliações de sinergismo e sensibilidade por microdiluição o meio MHB foi suplementado com Ca^{++} e Mg^{++} (MHB-CA) segundo o documento M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [15;16].

2.4 Teste de suscetibilidade para meropenem, polimixina B e gentamicina

2.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Para a determinação da MIC dos antimicrobianos polimixina B, Meropenem e Gentamicina foi realizado o método de microdiluição em caldo, usando MHB-CA, de acordo com os documentos M7-A9 do CLSI, 2012 e M100-S24 do CLSI, 2014 [15;16].O inóculo bacteriano final foi ajustado em 10^5 UFC/mL a partir do item 2.3.

Como controle de qualidade foram utilizadas cepas bacterianas da *American Type Culture Collection* (ATCC) - Rockville, Maryland, EUA como a cepa de *Escherichia coli*, ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853.

2.4.2 Disco difusão

Foi realizado de acordo com o documento M2-A11 do CLSI. A interpretação para meropenem e gentamicina seguiu os critérios do documento M100-S24 do CLSI e polimixina B segundo critérios do EUCAST [15;16].

2.4.3 E-test®

O método de E-test® foi realizado de acordo com normas estabelecidas pelo fabricante, sendo os resultados interpretados de acordo com os critérios de sensibilidade para enterobactérias segundo documento M100-S24 do CLSI [15;16].

2.5 Testes de sinergismo antimicrobiano

2.5.1 Metodologia *checkerboard*

O ensaio *Checkerboard* foi realizado em placas microdiluição de 96 cavidades contendo MHB-CA adicionado de diferentes concentrações de antimicrobianos (frações da MIC) isoladamente e em associações [17].

Foram realizadas duplas combinações, utilizando as associações possíveis entre polimixina B, meropenem e gentamicina, perfazendo as combinações; polimixina B x gentamicina; polimixina B x meropenem e gentamicina x meropenem.

Um inóculo de cada amostra na concentração final de aproximadamente 6×10^5 UFC/mL foi utilizado. A incubação foi realizada em aerobiose por 16 à 18 horas a 35°C. O cálculo do índice da fração inibitória ($\sum IFI$), através da fórmula: $\sum IFI = (MIC_{A+B}/MIC_A) + (MIC_{B+A}/MIC_B)$, onde: MIC A+B representa a MIC do antimicrobiano A quando associado ao antimicrobiano B; MIC B+A representa a MIC do antimicrobiano B quando associada ao antimicrobiano A; MIC A representa a MIC do antimicrobiano A quando testado isoladamente e MIC B representa a MIC do antimicrobiano B quando testado isoladamente.

Os resultados das combinações dos agentes antimicrobianos foram classificados de acordo com os critérios propostos por Pillai *et al.* (2005) [17] como: sinergismo ($IFI \leq 0,5$), indiferença ($IFI > 0,5 < 4$) e antagonismo ($IFI \geq 4$).

2.5.2 Metodologia *time-kill curve*

O teste foi realizado em tubos contendo 10 mL de MHB-CA, adicionados dos antimicrobianos em concentração de $\frac{1}{2}$ MIC sendo eles feitos isoladamente, combinados e o tubo controle sem antimicrobianos. Foi acrescentado em todos os tubos o inóculo bacteriano com concentração final de aproximadamente 6×10^5 UFC/mL que foram incubados em estufa à temperatura de 35°C sob agitação constante. Nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas um volume de 100 μ L dos tubos testes foi retirado e após diluições seriadas, 25 μ L foram plaqueados em duplicata utilizando-se o método da gota em meio de cultura MHA e incubadas em estufa a 35°C durante 16 à 18 horas. Após esse período, foi realizada a contagem de colônias bacterianas, e em seguida os dados foram plotados em um gráfico, numa curva logarítmica para posterior análise [17].

O critério de classificação para atividade sinérgica foi determinado de acordo com Pillai *et al.* (2005) [17], onde sinergismo foi definido como uma redução de ≥ 2 log UFC/mL da combinação antimicrobiana em relação ao agente bacteriano isolado mais ativo.

2.5.3 Método epsilométrico – E-test®

2.5.3.1 Cruzamento em 90°

A metodologia foi realizada de acordo com o método proposto por White *et al.*, (1996)[18], que consistem sobrepor, de forma entrecruzada em um ângulo de 90°, fitas E-test® (AB Biodisk Solna, Sweden) sendo incubada a 35°C por 16-20 horas. O cruzamento das fitas se realiza especificamente na intersecção das MICs, sendo necessário realizar o teste de sensibilidade por E-test® previamente. O efeito sinérgico é interpretado pela observação da queda da MIC de ambos antibióticos na zona da intersecção antimicrobiana pela somatória do índice da fração inibitória - \sum IFI [6;18].

2.5.3.2 Razão fixa

A metodologia de razão fixa segundo Manno *et al.* (2003), consiste em sobrepor uma segunda fita E-test® exatamente no mesmo local de uma primeira fita difundida em temperatura ambiente durante 1 hora. Estas foram incubadas a 35°C por 16-20 horas em areação. A leitura da MIC pôde ser realizada conjuntamente com a técnica ou anteriormente, sem que haja correção ou leitura diferencial. O efeito sinérgico é calculado pela somatória do

índice de fração inibitória que compara da MIC do antibiótico A isolado com a MIC do antibiótico A quando sobreposto pelo B. [6;18].

2.5.4 Disco difusão

2.5.4.1 Disco aproximação:

Para o teste de detecção de sinergismo por disco aproximação seguiu-se o preconizado por, Pillai *et al.* (2005)[17] onde a distância entre os discos foi calculada da seguinte maneira: Distância em mm = Raio de inibição do antibiótico A + Raio de inibição do antibiótico B + 5 mm.

$$\text{Distancia}_{(\text{mm})} = \text{RAIO (A)} + \text{RAIO (B)} + 5_{\text{mm}}$$

Para realização do método foi necessário conhecer o halo de inibição pelo método de disco difusão. Para detecção dos raios dos antimicrobianos A e B foi realizado o teste de disco difusão anteriormente. O aumento ou distorção do halo de inibição foi considerado como sinergismo, a diminuição ou formação de zona D foi considerada antagônico e quando não houve alteração dos halos o resultado foi considerado indiferente.

2.5.4.2 Disco Duplo

O teste de disco duplo foi baseado no trabalho de Manno *et al.*, (2003)[19] com modificações. Foram adicionados nas placas de MHA discos sozinhos e combinados. A combinação dos antimicrobianos foi realizada deixando difundir um primeiro disco com a droga A, que após duas hora de difusão foi retirado para que o segundo disco fosse colocado na impressão do anterior. O cálculo do sinergismo foi realizado comparando-se o halo de inibição do antimicrobiano A (obtido isoladamente) com o halo de inibição apresentado quando o antimicrobiano A foi sobreposto pelo B.

2.5.5 Metodologia time-kill curve modificado

Para a metodologia de TKCM modificado utilizou discos de antibióticos OXOID (UK) colocados em MHB e agitados em *vortex*. A concentração do antimicrobiano foi calculada de acordo com a concentração apresentada no disco.

A quantidade de discos e as diluições foram variáveis para alcançar a $\frac{1}{2}$ MIC de cada isolado. Assim, para alguns casos apenas um disco era utilizado, enquanto para outros, mais do que um (ou até mesmo diluições deste poderiam ser utilizadas), para que no final a concentração no MHB fosse adequada. Para a amostra Kp-40, por apresentar altos MICs, esta metodologia foi inviável. As outras etapas seguiram o descrito acima para o método padronizado de TKC, inclusive os cálculos.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados de determinação do sinergismo foram convertidas em valores binários (Para sinergismo = 1 e Indeference = 0). O percentual de concordância foi calculado pela proporção de respostas congruentes de TKC e CB para as metodologias de C 90°, RF, DA, DD e TKCM. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para mediar a relação linear entre escalas logarítmicas nas contagens de 6, 12 e 24 horas [7].

3. RESULTADOS

A resistência para polimixina B, meropenem e gentamicina entre os 8 isolados de *K. pneumoniae* tanto para os métodos de microdiluição em caldo, quanto para E-test® ou disco-difusão foi de 12,5%, 50% e 37.5% respectivamente (Tabela 1, 3, 4).

Não houve relação direta entre os resultados obtidos pelos métodos padrões de TKC e CB (Tabela 2), sendo a concordância entre os resultados de apenas 54,2%.

Em relação à TKC, a associação que mostrou maior atividade sinérgica foi PB+MR, já para CB, a melhor associação foi MR+GN, com 62.5% de sinergismo para ambas.

Independente do método, as amostras positivas para o gene *bla*_{KPC-2} mostraram maior percentagem de sinergismo. De 30 testes envolvendo 3 combinações (i.e 3 TKC e 3 CB) para 5 diferentes amostras, 15 apresentaram sinergismo. Em relação às amostras negativas para o gene *bla*_{KPC-2} apenas 4/18 foram sinérgicas (tabela 2).

Independente dos MICs obtidos, pelo método de E-test®, para os antimicrobianos avaliados, todos os resultados das combinações pelo método da razão fixa, bem como para o método de cruzamento em 90° foram indiferentes, variando a ΣIFI entre 1,0 e 3,9 (Tabela III).

A metodologia de DA utilizada para a avaliação da atividade sinérgica por disco difusão (tabela-2), não apresentou distorção dos halos de inibição, indicando que não houve sinergismo para qualquer associação testada. Na metodologia de DD em 3/16 testes os

resultados foram antagônicos para PB+MR, sendo todas as demais indiferentes para esta associação. Sinergismo foi observado pelo método de DD em 1/18 e 2/18 testes para PB+GN e MR+GN respectivamente.

Na maioria (56,3%) dos testes onde PB foi utilizada como primeiro antimicrobiano de difusão, houve diminuição do halo de inibição do antibiótico sobreposto em relação ao halo obtido quando o antimicrobiano foi testado isoladamente.

A TKCM apresentou atividade sinérgica em 76% (16/21) dos testes. A associação antimicrobiana em que houve maior detecção de sinergismo pela metodologia de TKCM foi de PB+GN com (85%) 6/7 seguida de PB+MR e MR+G ambas com (71%) 5/7 de detecção.

O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado na relação tempo 6-12 e 12-24 horas para cada combinação do teste TKCM. Seguindo a ordem P+M, P+G, M+G os resultados foram 0,88, 0,18, -0,00 entre 6 e 12 horas e 0,95, 0,82, 0,71 entre 12 e 24 horas de incubação.

Na interpretação do sinergismo para o teste TKCM, independente da variação do log apresentado para os diferentes isolados, observou-se que para a combinação PB+MR os resultados obtidos em 12 horas foram idênticos aqueles obtidos em 24 horas. Para a combinação MR+GN houve variação na interpretação apenas para 1 isolado (Kp-46*), enquanto na associação PB+GN houve variação na interpretação para 2 isolados (Kp-11 e Kp-33). Nestes 3 casos as amostras apresentavam interpretação de indiferença para 12 horas e passaram a ser sinérgicas em 24 horas.

A comparação das técnicas com as metodologias padrões TKC e CB estão descritas na Tabela VI. A metodologia de melhor concordância para a TKC foi a TKCM com 66,7%. Já a metodologia que melhor se correlacionou com o CB foram as de sinergismo com E-test® e DA ambas com 70,8% de concordância.

A maior sensibilidade em detectar o sinergismo quando a amostra se apresenta sinérgica nos métodos padrões (TKC e CB), foi verificada no método de TKCM com 90% em relação a TKC, e 83% em relação a CB. A especificidade verificada para TKCM foi de 40 e 27 % em relação TKC e CB respectivamente.

Todos os métodos que utilizaram difusão (discos ou E-test®) mostram especificidade maior que 97%, com sensibilidade sempre abaixo de 14%.

4. DISCUSSÃO

As combinações de antimicrobianos têm sido realizados com o objetivo de explorar um potencial sinérgico, prevenir ou atrasar o aparecimento de resistências e de aumentar o espectro de ação antimicrobiana, principalmente para tratamentos empíricos [20].

Em busca de novas metodologias para detecção laboratorial do sinergismo antimicrobiano, este estudo realizou comparação de metodologias padronizadas e laboriosas como CB e TKC, com novas metodologias de fácil execução na rotina laboratorial, assim como metodologias já propostas de fitas E-test® e disco-difusão, para determinação de atividade sinérgica *in vitro* contra isolados de *K. pneumoniae* produtores e não de bla_{KPC-2}. A partir desta comparação foi verificado que é possível a realização do teste de curva de morte de maneira simplificada, utilizando discos impregnados com antimicrobianos [4;5].

Os dois métodos *in vitro* mais utilizados na detecção de sinergismo são o CB e a TKC. O método CB mede o efeito bacteriostático, avaliando a atividade inibitória da associação. Já a TKC mede a atividade bactericida, avaliando quantitativamente a morte bacteriana [6].

Métodos utilizando fitas de E-test® têm sido utilizados para avaliação do potencial sinérgico antimicrobiano *in vitro* e podem ser realizados facilmente em um laboratório de rotina. Os principais métodos descritos na literatura são: (i) a aplicação de tiras de E-test® com um ângulo de 90° na intersecção das MICs[18]; (ii) a aplicação de tiras de E-test® em ágar e após difusão do antibiótico, a sobreposição de uma segunda fita na intersecção das MICs[21]; (iii) a aplicação de tiras de E-test® em agár e sua remoção após difusão do antibiótico sendo adicionada uma segunda fita no mesmo local[19]; e (iv) a adição de fitas em ágar contendo concentrações antimicrobianas sub inibitórias [22]. É importante ressaltar que para que os métodos (i,ii e iv) sejam funcionais é necessário conhecer a MIC do microrganismo a ser testado, o que gera o gasto adicional de tempo e fitas de E-test® quando comparado ao método (iii).

A comparação das metodologias CB e TKC neste estudo, mostrou concordância em apenas 54,2% para a detecção de sinergismo. Segundo Foweraker *et al.* (2009), isto não é surpreendente uma vez que se trata de técnicas que medem parâmetros diferentes. Logo devem ser utilizadas de maneira complementar e não de forma comparativa na detecção do sinergismo [8].

Tan *et al.* (2011) [23] ao compararem TKC, CB e E-test®, observaram que existe uma falta de concordância entre os métodos de detecção de sinergismo *in vitro*. Os dados resultantes desta pesquisa corroboram com esses, uma vez que a sensibilidade para estes métodos com E-test® foi nula. Ou seja, embora tenha sido observada concordância com CB de 70,8% e com TKC de 50%, a concordância foi em amostras que não foram sinérgicas.

Trabalhos como o de Bonapace *et al.* (2000) [6]; White *et al.* (1996) [18]; Rodriguez-cerrato *et al.* (2007) [24] e Principe *et al.* (2009) [25] que mostram concordância entre as técnicas, porém em sua maioria, avaliados número pequeno de bactérias [6;23;24].

Em nosso trabalho utilizamos o método de cruzamento em 90°, por se tratar de um método de fácil execução e interpretação. Além deste, também foi utilizado o método de razão fixa que demanda de menos um dia na execução dos demais sinergismos por E-test®, fato que é de extrema importância na clínica, já que o início rápido e apropriado é o fator primordial para reduzir a mortalidade. Porém para todos os 24 testes realizados com 3 combinações antimicrobianas, o resultado foi indiferente.

Pankey e Ashcraft, (2009) [26]; Pankey *et al.* (2013) [7] e He *et al.*, (2012) [27] avaliaram métodos por fita de E-test® observaram que o método de razão fixa tende a mostrar o resultado da droga mais ativa e não da combinação, fato também verificado no nosso estudo. Outra dificuldade do estudo foi o uso de fitas de polimixina B, por este antimicrobiano possuir uma estrutura molecular grande, tornando-o um composto de difícil difusão no ágar, influenciando na interpretação dos resultados.

Para as metodologias de disco difusão utilizadas na detecção de sinergismo antimicrobiano, pôde-se verificar diferenças nos resultados entre a metodologia de DA e de DD. A medida do sinergismo por DA, apesar de já estar descrita na literatura não foi estabelecida uma distância padrão pra que os discos sejam dispostos, sendo baseada no halo de inibição anteriormente determinado para cada antimicrobiano isolado. Assim, estabeleceu-se a somatória dos raios de inibição acrescentado de cinco milímetros como distância entre os discos. Desta maneira em nenhum teste realizado houve a formação de halos sinérgicos. Uma possível justificativa é a dificuldade em se estabelecer esta distância. Fato que provavelmente influenciou a verificação do sinergismo, ou ainda, que algumas moléculas dos antibióticos, como a polimixina B, se difundirem pouco em meio solidificado, não permitindo a interatividade adequada.

O método de DD apresentou sinergismo em somente 3/18 (16%) dos resultados. Na realização da metodologia de DD observou-se que, quando a polimixina B foi utilizada como primeira droga (difusão por 2 horas) havia tendência em diminuição da formação do halo de inibição do antimicrobiano sobreposto. Uma hipótese para esse achado é a possibilidade da molécula de polimixina diminuir a difusão de uma segunda droga por suas propriedades químico-físicas, saturando a permeabilidade do meio. Esta hipótese também podem ser aplicada no sinergismo que utiliza-se de E-test®, principalmente para polimixina B, o que

explicaria a dificuldade de vários autores de observar sinergismo nos métodos que a utilizam[7].

Gur *et al.* (1999) [28] utilizaram amostras de *Brucella melitensis* para comparar a metodologia de sinergismo por CB e E-test® em ângulo de 90°. Apesar de alguns estudos relatarem concordância entre as técnicas, a concordância verificada neste estudo foi de apenas 55% [28]. Por outro lado, Manno *et al.* (2003) [19] observaram alta relação entre sinergia utilizando fitas de E-test® e CB contra amostras de *Burkholderia capacia* isoladas de pacientes com fibrose cística [19]. Neste estudo, embora a correlação entre CB e E-test® em ângulo de 90° tenha sido de 70,8%, em nenhum caso o teste foi capaz de detectar sinergismos, sendo apenas possível averiguar diminuição da MIC de um dos antimicrobianos da associação.

Kumar *et al.* (2004) [29] realizaram testes de sinergismo por CB e disco-difusão. Apesar das técnicas se mostrarem relacionadas em termos de resultados, a forma de avaliar o que é sinergismo, é complexa, sendo necessários mais estudos sobre difusão para que uma boa correlação seja possível.

Considerando que as metodologias de detecção de sinergismo *in vitro* são controversas, a busca de novas metodologias se faz necessária. Em nosso estudo estamos propondo duas novas metodologias: 1- metodologia de DD que é baseada no princípio do método de E-test® de razão fixa e 2- o método de TKCM onde a curva de morte é realizada em meio de cultura líquido onde são adicionados disco de antimicrobianos.

O método de DD não mostrou bons resultados pela dificuldade de difusão das drogas a exemplo do que ocorreu com a metodologia de E-test® de razão fixa. Entretanto, os resultados para os testes de TKCM são muito animadores. As mudanças relativamente simples na metodologia TKCM possibilitarão sua aplicação em um laboratório de rotina clínica.

Os discos dos diferentes antimicrobianos utilizados em rotina serão ser adicionados em caldo de MH em concentrações variáveis, e incubados com o isolado clínico contra o qual a associação antimicrobiana pretenda ser utilizada. Para leitura, o laboratório clínico poderá utilizar um nefelômetro ou até mesmo a observação visual da turvação e, assim, poderá indicar se a associação será sinérgica contra o isolado clínico. Isso pode diminuir gastos com placas e tempo de incubação, já que a quantidade de bactérias entre 10^6 e 10^7 UFC/mL é facilmente detectável. Utilizando o coeficiente de correlação de Pearson verificou-se uma relação linear entre as escalas logarítmicas nas contagens de 12 e 24 horas, mostrando que o momento 12 horas pode nos adiantar um possível resultado, não sendo necessário um período maior para detecção do sinergismo.

Os dados obtidos com os isolados positivos e negativos para o gene *bla*_{KPC2} mostraram que, tanto para isolados resistentes como sensíveis, o método de TKCM se correlacionou em 66,7% com o método padrão de TKC. Também acredita-se, a partir desta pesquisa, ser o método de TKCM um possível procedimento aplicado na detecção do sinergismo. Visto que, entre todos os métodos avaliados, a maior sensibilidade em detectar o sinergismo quando a amostra se mostrava sinérgica nos métodos padrões (TKC e CB), foi verificada no método de TKCM com 90% em relação a TKC e 83% em relação a CB. A especificidade verificada para TKCM foi de 40% e 27% em relação TKC e CB respectivamente.

Embora o número de isolados utilizados nesse estudo tenha sido pequeno, a variabilidade de características entre eles, como clonalidade e perfil de sensibilidade, a torna uma amostragem qualificada para avaliação de sinergismo.

Assim considerando os dados observados neste estudo, com os isolados e associações antimicrobianas testadas (i.e. PB+MR, MR+GN e PB+GN), concluímos que as metodologias baseadas em E-test tanto em razão fixa e cruzamento em 90°, bem como as metodologia de disco difusão são ineficazes na detecção do sinergismo e que o método de TKCM proposto neste estudo mostrou ser um método sensível e rápido na detecção do sinergismo podendo ser facilmente implantado em um laboratório de rotina.

REFERÊNCIAS

- [1] Lynch JP, III, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother* 2013 Feb;14(2):199-210.
- [2] Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, et al. Antibiotic usage and risk of colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria: a hospital population-based study. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Oct;53(10):4264-9.
- [3] Chow JW, Yu VL. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. *Int J Antimicrob Agents* 1999 Jan;11(1):7-12.
- [4] Zhao C, Xie W, Zhang W, Ye Z, Wu H. [Mechanism of drug resistance of carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* and the application of a combination of drugs in vitro]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2014 Apr;30(2):166-70.
- [5] Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012 Oct;25(4):682-707.
- [6] Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000 Sep;38(1):43-50.
- [7] Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest((R)) methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 Nov;77(3):220-6.
- [8] Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Nov;53(11):4809-15.
- [9] Grzybowska W, Banaszczyk-Rus M, Wojcik A, Tyski S. [Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined]. *Med Dosw Mikrobiol* 2004;56(4):391-403.
- [10] Reiter KC, Fuchs SC, Barcellos NT, Zavascki AP. Risk factors for community-acquired infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2009 Apr 27;169(8):811-2.
- [11] Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Christofidou M, et al. Risk factors for infection and predictors of mortality among patients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 2014 Sep;46(9):642-8.
- [12] Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004 Oct;25(10):847-51.

- [13] Izdebski R, Baraniak A, Herda M, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2014 Sep 12.
- [14] Silbert S, Boyken L, Hollis RJ, Pfaller MA. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003 Dec;47(4):619-21.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Ninth edition. M07-A9. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement. M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.
- [17] Pillai SK, Eliopolous GM; Moellering RC (2005). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5rd edn, (Lorian, V., Ed.), pp. 366–425. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- [18] White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Aug;40(8):1914-8.
- [19] Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003 Jan;22(1):28-34.
- [20] Hofer B, Dantier C, Gebhardt K, Desarbres E, Schmitt-Hoffmann A, Page MG. Combined effects of the siderophore monosulfactam BAL30072 and carbapenems on multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 2013 May;68(5):1120-9.
- [21] Pankey G, Ashcraft D, Patel N. In vitro synergy of daptomycin plus rifampin against *Enterococcus faecium* resistant to both linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Dec;49(12):5166-8.
- [22] Perichon B, Courvalin P. Synergism between beta-lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the *vanA* operon. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Nov;50(11):3622-30.
- [23] Tan TY, Lim TP, Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL. In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jan;55(1):436-8.
- [24] Rodriguez-Cerrato V, Garcia P, Del PG, et al. In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Antimicrob Chemother* 2007 Nov;60(5):1159-62.

- [25] Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009;8:18.
- [26] Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest and time-kill assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009 Feb;63(2):228-32.
- [27] He W, Kaniga K, Lynch AS, Flamm RK, Davies TA. In vitro Etest synergy of doripenem with amikacin, colistin, and levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* with defined carbapenem resistance mechanisms as determined by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 Dec;74(4):417-9.
- [28] Gur D, Kocagoz S, Akova M, Unal S. Comparison of E test to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Sep;43(9):2337.
- [29] Kumar AK, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar GS, Ray R. 2004. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. *Biol.Pharm.Bull.* 27:1116-1120.

Tabela I – Isolados de *Klebsiella pneumoniae* incluídas no estudo.

Isolados	Centros médicos de isolamento	ST	Clone/ ERIC-PCR	gene <i>bla</i> _{KPC}	MIC (µg/mL)		
					PB	MR	GN
Kp-5	João Pessoa	437		Pos.	1	1	256
Kp-9	São Paulo	133		Pos.	1	16	0,5
Kp-28	São Paulo	617		Pos.	1	1	0,5
Kp-40	Recife	11		Pos.	1	256	256
Kp-46	Campo Grande	17		Pos.	32	32	0,5
Kp-11	Maringá		A	Neg.	0,5	0,06	0,25
Kp-33	Maringá		B	Neg.	0,5	0,125	0,5
Kp-37	Maringá		C	Neg.	0,25	16	64

ST – *Sequence typing*;ERIC –*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*; PCR – *Polymerase chain reaction*; *bla* – *Beta lactamase*; MIC – *Concentração Inibitória Mínima*; PB – *Pomilixina B*; MR – *Meropenem*; GN – *Gentamicina*; Pos. – *Positivo*; Neg. – *Negativo*.

Tabela II. Resultados de sinergismo obtidos para as oito amostras de *Klebsiella pneumoniae* pelo métodos padrões de *Time Kill curve* e *Checkerboard*.

Isolados	TKC			CB		
	PB+MR	PB+G	MR+GN	PB+MR	PB+G	MR+G
	N			N		
	Variação de log 24h			Valores de IFI		
Kp-5*	0,6(I)	4,7(S)	8,8(S)	0,5(I)	1,5(I)	0,1(S)
Kp-9*	7,6(S)	3,5(S)	3,4(S)	2,0(I)	2,0(I)	0,2(S)
Kp-28*	-0,3(I)	0,0(I)	0,8(I)	1,5(I)	0,7(I)	0,2(S)
Kp-40*	2,4(S)	1,9(I)	-0,1(I)	2,0(I)	2,0(I)	0,2(S)
Kp-46*	5,8(S)	5,7(S)	3,6(S)	0,2(S)	0,6(I)	0,2(S)
Kp-11	-0,3(I)	0,1(I)	-0,6(I)	2,0(I)	0,4(S)	2,0(I)
Kp-33	4,1(S)	8,4(S)	-0,2(I)	2,0(I)	3,0(I)	2,0(I)
Kp-37	4,0(S)	-0,6(I)	0,5(I)	2,0(I)	2,0(I)	2,0(I)

MR - Meropenem; PB – Polimixina B; GN – Gentamicina; TKC – Curva de morte; CB – Checkerboard; IFI - Índice da fração inibitória; MIC – Concentração inibitória mínima; (I) – Indiferente; (S) – Sinergismo.

Valor IFI = Sinergismo ($IFI \leq 0,5$), indiferente ($IFI > 0,5 < 4$) e antagonismo ($IFI \geq 4$).

Variação de Log = Sinergismo ($\log \geq 2,0$), indiferente ($\log > -2 < 2$) e antagonismo ($\log \leq -2$)

* Amostras positivas para o gene *bla*_{KPC-2};

Tabela III, Resultados do sinergismo envolvendo a metodologia de E-test para isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Isolado	MIC µg/mL (E-test)			IFI Razão fixa			IFI Cruzamento em 90°		
	PB	MR	GN	PB +MR	PB +GN	MR +GN	PB +MR	PB +GN	MR +GN
Kp-5*	0,5	0,5	48	1,0	1,0	1,6	2,0	2,0	2,0
Kp-9*	0,38	>32	0,25	1,3	1,2	1,0	2,0	2,0	2,0
Kp-28*	0,5	0,38	0,47	1,1	1,2	0,9	2,0	2,0	2,0
Kp-40*	0,5	>32	>256	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Kp-46*	12	>32	0,125	1,0	1,6	3,9	2,0	2,0	2,0
Kp-11	0,5	0,023	0,125	3,3	3,5	3,3	2,0	2,0	2,0
Kp-33	0,5	0,047	0,38	2,4	3,6	2,0	2,0	2,0	2,0
Kp-37	0,38	6	32	1,3	1,3	1,1	2,0	2,0	2,0

MR - Meropenem; PB – Polimixina B; GN – Gentamicina; IFI - Índice da fração inibitória; MIC – Concentração inibitória mínima,

Resultado IFI = Sinergismo ($IFI \leq 0,5$), indiferente ($IFI > 0,5 < 4$) e antagonismo ($IFI \geq 4$),

*Amostras positivas para o gene *bla*_{KPC-2};

Tabela IV. Resultados do sinergismo pela metodologia de Disco Duplo para os isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Isolado	Disco-difusão Halo (mm)			Aumento ou diminuição do Halo (mm) da associação (A+B e B+A)		
	PB	MR	GN	PB+MR / MR+PB	PB+GN / GN+PB	MR+GN / GN+MR
Kp-5*	12	21	6	-6 ^{oo} / -5 ^{oo}	0/+1	+1/+3
Kp-9*	13	18	19	-6 ^{oo} / -4	+3/+5 [•]	+5 [•] / +5 [•]
Kp-28*	13	19	20	-3/-2	0/+1	+1/+1
Kp-40*	14	6	6	-3/0	-1/+2	0/0
Kp-46*	12	16	19	-3/0	+3/+4	+2/+4
Kp-11	13	28	23	-4/+2	0/0	+3/+1
Kp-33	13	29	24	-7 ^{oo} / -1	-4/-3	0/-3
Kp-37	14	14	6	+1/0	0/-1	-1/0

MR - Meropenem; PB – Polimixina B; GN – Gentamicina; IFI - Índice da fração inibitória; MIC – Concentração inibitória mínima.

* Amostras positivas para o gene *bla*_{KPC-2};

• Resultados Sinérgicos

^{oo} Resultados Antagônicos

Halos Positivos(+): Aumento do halo de inibição na associação em relação ao maior halo dos antimicrobianos sozinho.

Halos Negativos(-): Diminuição do halo de inibição na associação em relação ao maior halo do antimicrobiano sozinho.

Resultado: Sinergismo (Halo $\geq +5$ mm) indiferente (Halo $> -4 < +4$) e antagonismo (Halo ≤ -5).

Tabela V- Método de *time kill curve* modificada: variações dos log de UFC/mL ao longo do tempo.

Isolado	TKCM			TKCM			TKCM			TKCM		
	Variação Log UFC/mL- 6 h			Variação Log UFC/mL- 12 h			Variação Log UFC/mL- 24 h			Coeficiente de Pearson		
	PB+MR	PB+GN	MR+GN	PB+MR	PB+GN	MR+GN	PB+MR	PB+GN	MR+GN		6/12h	12/24h
Kp-5*	-0,4(I)	1,2(I)	-0,3(I)	0,2(I)	5,2(S)	4,9(S)	-0,2(I)	8,5(S)	3,5(S)	PB+	0,88	0,95
Kp-9*	0,0(I)	2,9 (S)	0,55(I)	4,9(S)	6,0(S)	2,3(S)	4,9(S)	6,7(S)	3,5(S)			
Kp-28*	1,3(I)	-0,0(I)	-0,4(I)	7,6(S)	3,5(S)	-1,8(I)	8,4(S)	4,4(S)	0,8(I)	PB+	0,18	0,82
Kp-40*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
Kp-46*	-0,2(I)	0,1(I)	-0,0(I)	4,7(S)	2,8(S)	1,3(I)	6,2(S)	2,9(S)	2,5(S)	GN		
Kp-11	-0,4(I)	-0,9(I)	-0,8(I)	2,3(S)	0,3(I)	4,2(S)	4,8(S)	3,5(S)	5,0(S)			
Kp-33	-0,7(I)	05(I)	-0,7(I)	-1,5(I)	1,2(I)	0,7(I)	-0,1(I)	4,0(S)	1,4(I)	MR+	-0,0	0,71
Kp-37	0,8(I)	0,6(I)	0,0(I)	6,1(S)	1,0(I)	2,5(S)	8,7(S)	1,8(I)	6,2(S)			

MR - Meropenem; PB – Polimixina B; GN – Gentamicina; TKC – Curva de morte; TKCM – Curva de morte modificada; CB – Checkerboard; IFI - Índice da fração inibitória; MIC – Concentração inibitória mínima; (I) – Indiferente; (S) – Sinergismo; NT – Não testada,

Resultado IFI = Sinergismo ($IFI \leq 0,5$), indiferente ($IFI > 0,5 < 4$) e antagonismo ($IFI \geq 4$),

Resultado Log = Sinergismo ($\log \geq 2,0$), indiferente ($\log > -2 < 2$) e antagonismo ($\log \leq -2$)

* Amostras positivas para o gene *bla_{KPC-2}*;

Tabela VI – Resultados da comparação das metodologias de sinergismo com as metodologias padrões *time kill curve* e *checkerboard*.

	<i>Time Kill Curve</i>					<i>Chequerboard</i>				
	C90°	RF	DA	SDD	TKCM	C90°	RF	DA	SDD	TKCM
% de C (NC/NT)	50(12/24)	50(12/24)	50(12/24)	52,1(25/48)	66,7(14/21)	70,8(17/24)	70,8(17/24)	70,8(17/24)	64,6(31/48)	42,9(9/21)
Sensibilidade	0	0	0	13	90	0	0	0	14	83
Especificidade	100	100	100	100	40	100	100	100	97	27

C – Concordância; NC – Numero de testes concordantes; NT-Numero total de testes; C90° - Método E-test cruzamento 90°; RF – Método E-test razão fixa; DA – Método Disco aproximação; SDD – Método de Disco Duplo; TKCM – Método Time kill curve modificado.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Baseado nos dados apresentados no presente estudo concluiu-se que:

- 1- Não houve correlação direta na detecção do sinergismo entre as metodologias padrões de TKC e CB;
- 2- Os métodos de sinergismo E-test® cruzamento em 90°, E-test® razão fixa e disco aproximação e disco duplo foram ineficazes na detecção do sinergismo;
- 3- No método de E-test® razão fixa a sombra da elipse formada pelo antimicrobiano de menor MIC interferiu na leitura do teste resultando em resultados de Σ IFI ente 0,9 e 3,9 considerados indiferentes.
- 4- O método de TKCM, proposto neste estudo, mostrou ser um método sensível e de fácil execução na detecção do sinergismo.
- 5- A linearidade do TKCM entre o tempo 12h e 24h, verificada pelo coeficiente de correlação de Spearman, demonstrou a possibilidade de leitura do teste de TKCM para verificação do sinergismo com apenas 12 horas de incubação.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados mostram que a utilização do método TKCM para detecção de sinergismo *in vitro* pode auxiliar na detecção rápida e sensível do sinergismo antimicrobiano, podendo ser implantada dentro de um laboratório de rotina. Porém, mais estudos são necessários utilizando outros grupos de microrganismos como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* afim de que seja realmente comprovada a sua aplicabilidade em amostras multirresistentes. Estudos *in vivo* também são essenciais para a verificação se os dados de sinergismo obtidos *in vitro* possam se traduzir em eficácia clínica.

ANEXOS

INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS

Official Journal of the International Society of Chemotherapy

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTSXX

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

ISSN: 0924-8579

DESCRIPTION

The *International Journal of Antimicrobial Agents* provides comprehensive and up-to-date peer

reviewed reference information on the physical, pharmacological, *in vitro* and clinical properties of individual **antimicrobial agents** (**antiviral** agents, **antiparasitic** agents, **antibacterial** agents, **antifungal** agents, etc.). In addition, the journal signals new trends and developments in the field through highly authoritative review articles on antimicrobial agents. Special attention is given to articles providing insight into the problems of **antimicrobial resistance** both in the hospital and in the community. Both solicited reviews by top experts in the mentioned fields and high-quality original research papers are published.

Additional information on the ISC and its activities can be found at the ISC Web site at:

<http://www.ischemo.org>

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discountson Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any furtherinformation or help, please visit our support pages:

<http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Clinical Microbiologists, Pharmacists, Pharmaceutical Scientists, Bacteriologists, Pharmacologists, Clinical Virologists, Medical Practitioners.

IMPACT FACTOR

2013: 4.259 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
2

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Elsevier BIOBASE

Cambridge Scientific Abstracts

Current Contents/Life Sciences

MEDLINE®

EMBASE

Pascal et Francis (INST-CNRS)

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

AM Geddes, Birmingham, UK

Editorial Office

J. Merrison, Oxford, England, UK

Review Editor

Editors

R. Allaker, London, UK

S. Barrett, London, England, UK

N. Beeching, Liverpool, UK

R.S. Bharadwaj, Gujarat, India

M. Brown, London, UK

C. Conlon, Oxford, UK

G Coombs, Perth, Western Australia, Australia

C. Costelloe, London, England, UK

P. Coyle, Belfast, Northern Ireland, UK

B.A. Cunha, MD, Mineola, New York, USA

S. Dancer, Glasgow, Scotland, UK

V Dartois

H. Derendorf, Gainesville, Florida, USA

M Ellington, Cambridge, England, UK

M Enright, London, UK

A Ghafur, Chennai, India

E.J. Giamarellos-Bourboulis, Athens, Greece

H. Giamarellou, Athens, Greece

E. Gotuzzo, Lima, Peru

J Gray, Birmingham, England, UK

P.R. Hsueh, Taipei, Taiwan

S.H. Jeong, Seoul, South Korea

D. Law, Manchester, England, UK

V.K.E. Lim, Kuala Lumpur, Malaysia

J Lipman, Brisbane, Queensland, Australia

DM Livermore, London, UK

KG Naber, Munich, Germany

A Novelli, Firenze, Italy

A O'Neill, Leeds, England, UK

D Paterson, Herston, Queensland, Australia

L.A. Poirel, Le Kremlin-Bicetre, France

J Roberts, Brisbane, Queensland, Australia

JM Rolain, Marseille, France

A Seaton, Glasgow, Scotland, UK

A Shibl, Riyadh, Saudi Arabia

S Simjee, Basingstoke, England, UK

S Stefani, Catania, Italy

P.A. Tambyah, Singapore, Singapore

A Tsakris, Athens, Greece

PM Tulkens, Brussels, Belgium

J Walochnik, Vienna, Austria

M Wang, Beijing, China

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag

International Advisory Board

H.E. Akalin, Erenkoy, Istanbul, Turkey

J. Andrews, West Midlands, UK

B. Barsic, Zagreb, Croatia

E. Bergogne-Berezin, Paris, France

K.A. Brogden, Southwestern United States, Washington, USA

K Bush, Bloomington, Indiana, USA

W.A. Craig, Madison, Wisconsin, USA

E. De Clercq, Leuven, Belgium

CB Del Mar, Robina, Queensland, Australia

D. Denning, Manchester, UK

R Feld, Toronto, Ontario, Canada

A.P. Fraise, Birmingham, England, UK

J. Garau, Province of Barcelona, Spain

J.A. Garcia-Rodriguez, Salamanca, Spain

I.M. Gould, Aberdeen, UK

M.L. Grayson, Heidelberg, Victoria, Australia

K.A. Hiramatsu, Tokyo, Japan

I.M. Hoepelman, Utrecht, Netherlands

N. Høiby, Copenhagen K, Denmark

R. Jones, North Liberty, Iowa, USA

G. Kahlmeter, Växjö, Sweden

K.P. Klugman, Atlanta, Georgia, USA

H.C. Korting, München, Germany

G Kronvall, Solna, Sweden

D. Lew, Geneva, Switzerland

A. MacGowan, Bristol, UK

F. MacKenzie, Aberdeen, UK

L.A. Mandell, Hamilton, Ontario, Canada

T. Matsumoto, Fukuoka Prefecture, Japan

T. Mazzei, Firenze, Italy

C.E. Nord, Solna, Sweden

M. Pelemis, Belgrade, Serbia

T.V. Riley, Perth, Western Australia, Australia

V. Rolny

R Saginur, Ottawa, Ontario, Canada

F. Scaglione, Milan, Italy

A.M. Sefton, London, UK

J.H. Song, Seoul, South Korea

M.J. Struelens, Bruxelles, Belgium

F. Tenover, Sunnyvale, California, USA

J. Verhoef, Utrecht, Netherlands

M. Yagisawa, Tokyo, Japan

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag

4

GUIDE FOR AUTHORS

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Types of paper

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words and 30 references (as

above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Opinions and Commentaries: These take the same form as a review.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 15 references and a maximum of 3 figures or tables.

Leaders: These tend to be invited papers but unsolicited Leaders are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

It is required that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail, phone and fax numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 1 of the potential reviewers is from a different country to the authors.

Contact details for submission

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see

<http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure

that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of

the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag 5registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Please complete and upload this form: (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere

in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and

interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to verify author contributions.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by

the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, whom must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the

manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
6

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your

article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License

Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
7

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
 - An open access publication fee is payable by authors or their research funder
- Subscription**
- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No open access publication fee All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA). **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The open access publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a

mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
8

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier

on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source

files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision

and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ijaa/default.asp>.

Authors must supply the names and email addresses of 4 to 5 potential reviewers (e-mail, phone and fax numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, are not located in the same institution and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 2 of the potential reviewers are from a different country to the authors. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (before submission), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid,

use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. *Embedded math equations* If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information (http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/).

Article structure

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
9

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2,...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing

and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area**

code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office

files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
10

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more

conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 AUTHOR INFORMATION
 PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag 11
 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'grayscale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation.

When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag
12

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith

RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version

of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages

at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is

directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014
www.elsevier.com/locate/ijantimicag 13

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Please ensure that the following are included in your submission:
 - | One author designated as corresponding author:
 - | Their E-mail address
 - | Full postal address
 - | Telephone and fax numbers
 - | Keywords
 - | Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently

elsewhere | All figure captions | All tables (including title, description, footnotes) | All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail | Manuscript has been spell checked | All text pages have been numbered | References are in the correct format for this journal | All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa | Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) | Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe

site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections

(including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other

comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one AUTHOR INFORMATION PACK 26 Oct 2014 www.elsevier.com/locate/ijantimicag 14