

Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Evaluación comparativa de la modulación de antibióticos frente a cepas bacterianas de Escherichia Coli, Staphylococcus

Comparative Evaluation of the Modulation of Antibiotic-Activity against Strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus

Henrique D. M. Coutinho PhD¹, Sharlene M. O. Brito MSc², Nadghia F. Leite², Vivianne C. S. Vandesmet MSc², Maria T. A. Oliveira MSc², Gioconda M. A. B. Martins MSc², Ana Raquel P. Silva BSc³, Maria do Socorro Costa BSc³

Recibido: 3 de noviembre de 2014 • Aceptado: 27 de junio de 2015

Doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud13.03.2015.02](https://doi.org/10.12804/revsalud13.03.2015.02)

Para citar este artículo: Coutinho HDM, Brito SMO, Leite NF, Vandesmet VCS, Oliveira MTA, Martins GMAB, et al. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Rev Cienc Salud. 2015;13(3):345-354. doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud13.03.2015.02](https://doi.org/10.12804/revsalud13.03.2015.02)

Resumo

Introdução: Combinações múltiplas de drogas estão sendo utilizadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. No entanto, a utilização incorreta desses antibióticos fez com que algumas bactérias sejam selecionadas, deixando apenas as resistentes aos agentes antimicrobianos, com o conseqüente surgimento de resistência aos antibióticos. **Objetivos:** Nesse contexto, avaliaram-se as atividades microbiológicas dos antibióticos claritromicina, gentamicina, ciprofloxacino e imipenem, além de comparar as atividades da associação entre esses fármacos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Materiais e Métodos:** A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo para cada uma das amostras selecionadas. Posteriormente, com base nos valores das CIMs, foi avaliado o efeito antimicrobiano da combinação das drogas pelo método de modulação. **Resultados:** A associação demonstrou efeitos sinérgicos frente às linhagens testadas, sugerindo-se que a associação dos antibióticos testados aumenta o seu potencial antimicrobiano. **Conclusão:** Nesse sentido, o uso de

1 Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.
Correio eletrônico: hdmcoutinho@gmail.com

2 Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

3 Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

antibióticos em combinação pode ser realizado mediante investigações posteriores que comprovem a segurança de seu uso.

Palavras-chave: Resistência a Antibióticos, atividade microbiológica, associação de antibióticos, potencial antimicrobiano.

Resumen

Introducción: Actualmente, se está utilizando la combinación de múltiples drogas en la lucha contra la propagación de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Sin embargo, el uso inadecuado de estos antibióticos ha causado que algunas bacterias se seleccionen, con la consiguiente aparición de resistencia a los antibióticos. *Objetivo:* Se evaluó la actividad microbiológica de los antibióticos claritromicina, gentamicina, ciprofloxacino e imipenem, y se comparó la actividad sinérgica de estos fármacos, frente a las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Materiales y Métodos:* Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo para cada una de las muestras seleccionadas y se evaluó el efecto antimicrobiano de la combinación de fármacos por el método de modulación. *Resultados:* La combinación mostró efectos sinérgicos frente a las cepas ensayadas, lo que sugiere que la asociación de los antibióticos ensayados aumenta su potencial antimicrobiano. *Conclusión:* Se puede utilizar antibióticos en combinación; sin embargo, se requiere realizar investigaciones adicionales que demuestren ser seguros para su utilización.

Palabras clave: Resistencia a antibióticos, actividad microbiológica, asociación de antibióticos, potencial antimicrobiano.

Abstract

Introduction: Combining multiple drugs is an strategy used to combat the dissemination of pathogenic and drug resistant bacteria. However, the misuse of these drugs against bacteria have caused the selection of more resistant specimens called multidrug-resistant bacteria. *Objective:* In this work we evaluated the antibiotic activity of claritromicin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenen, alone or associating one by one, against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Material and methods:* The minimal inhibitory concentration (MIC) was performed using the microdilution assay. Based in the MIC values, the antibiotic effect of the drugs alone and in association were determined. *Results:* The association between the drugs demonstrated the synergism against the bacterial strains. *Conclusion:* The use of the combined antibiotic-therapy can be positively performed, but additional studies have to be conducted first for proving that its use is safe.

Keywords: Resistance to antibiotics, Microbiological activity, Association between antibiotics, Antimicrobial activity.

Introdução

Durante muitas décadas, foram desenvolvidos fármacos na tentativa de combater, de modo eficiente, infecções bacterianas, o que ocasionou a redução da mortalidade causada por doenças microbianas (1). No entanto, a utilização incorreta desses antibióticos fez com que algumas bactérias fossem selecionadas, deixando apenas as resistentes aos agentes antimicrobianos, com o conseqüente aparecimento de resistência aos antibióticos (2, 3), um problema crescente e preocupante. Para os pacientes, a resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde significa aumento de custos (4, 5).

Os microrganismos possuem vários mecanismos pelos quais podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos, dentre eles: alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (6).

Atualmente combinações múltiplas de drogas estão sendo utilizadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Relatos indicam que, diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas, são comuns. É o caso da combinação de penicilina com a gentamicina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal, alterando a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (7).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (8).

Este trabalho teve como objetivos avaliar as atividades microbiológicas dos antibióticos claritromicina 2500µg, gentamicina 2500µg, ciprofloxacino 2500µg e imipenem 2500µg, considerando o potencial antimicrobiano, além de avaliar comparativamente as atividades decorrentes da associação entre gentamicina, ciprofloxacino e imipenem com a claritromicina frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Material e métodos

Linhagens celulares utilizadas: Os microrganismos analisados neste trabalho foram bactérias de linhagens multirresistentes *E. coli* 27 e *S. aureus* 358. Todas as linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) e Brain Heart Infusion - BHI (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante e a 10%. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente. As bactérias foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a ± 35 °C, durante 24 horas.

Antibióticos: As drogas utilizadas neste trabalho foram: claritromicina, gentamicina, ciprofloxacino e imipenem, todos em uma concentração de partida de 2500µg cujas diluições variaram de 1,250 – 0,7 µg/mL obtidos da Sigma Chemical Co. Todas as drogas foram dissolvidas em água estéril.

A claritromicina pode ter efeito bactericida ou bacteriostático, atuando como imunomodulador de doenças inflamatórias do trato respiratório, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (9). Produzem efeitos adversos nos pacientes quando usados com Digoxina, Midazolam ou Triazolam e Teofilina, aumentando

as concentrações sanguíneas e fazendo com que seu efeito seja aumentado, além de predispor aos seus efeitos tóxicos como distúrbios da visão e arritmias cardíacas (10).

A gentamicina é um aminoglicosídeo bactericida de amplo uso clínico, o qual age inibindo a síntese proteica de bacilos gram-negativos (11). Tal antibiótico, não deve ser combinado com outras substâncias ototóxicas e nefrotóxicas, pois pode potencializar tais efeitos. Apresenta ainda atividade bloqueadora neuromuscular, valendo ressaltar que tais alterações dependem da administração de doses múltiplas e intolerância do indivíduo (12).

Já o Imipenem é produzido a partir da bactéria *Streptomyces cattleya*, pertencente aos carbapenêmicos. Este antibiótico atua inibindo diretamente a parede celular de bacilos gram-positivos e gram-negativos, obtendo melhor resultado em bacilos gram-negativos (13).

Por fim, o ciprofloxacino consiste em um antibiótico pertencente ao grupo dos quinolônicos, utilizado no tratamento de patologias causadas por microorganismos gram-positivos e gram-negativos. Seu mecanismo de ação decorre da inibição da síntese do DNA bacteriano, pelo bloqueio da enzima girase. É contra indicado em caso de uso concomitante com Tizanidina e Amiodarona, resultando em hipotensão, efeito sedativo e aumento dos riscos cardiotoxicidade, diminuindo também a eficácia de sua ação (14).

Concentração Inibitória Mínima (CIM): A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (15). Os microrganismos mantidos em HIA foram inoculados em 3ml de caldo BHI por 24h à 35°C, afim de formar uma suspensão de 10^5 UFC/mL. Uma solução contendo 1350 μ L de BHI (10%) e 150 μ L do inóculo foi colocada em cada um dos *ependorfs*. Em seguida foram distribuídos 100 μ L da solução contendo BHI

com inóculo, em cada cavidade da placa de microdiluição e logo em seguida adicionados 100 μ L do antibiótico a ser modulado na primeira cavidade, sendo passado para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade. A última cavidade foi reservada para controle (meio + inóculo).

A concentração inicial de todos os antibióticos utilizados foi de 2500 μ g/mL, variando nos poços das placas de microdiluição de 1250 - 0,7 μ g/mL. As placas foram colocadas na estufa numa temperatura de aproximadamente 35°C, por um período de 24 horas (15).

A CIM de cada antibiótico foi posteriormente determinada, sendo as revelações das CIM bacterianas realizadas utilizando-se a resazurina.

Modulação da atividade antibiótica por microdiluição

As soluções dos antibióticos foram testadas em concentração sub-inibitória (MIC/8) (7). Foram distribuídos 100 μ L de uma solução contendo BHI, inóculo e o antibiótico modulado em cada poço no sentido numérico da placa. Em seguida, 100 μ L da droga moduladora foram misturados ao primeiro poço, procedendo-se a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. A gentamicina, o ciprofloxacino e o imipenem agiram como agente modulador da claritromicina. Posteriormente, a claritromicina assumiu o papel de modulador dos demais antibióticos. O efeito sinérgico foi observado a partir da redução da CIM dos antibióticos quando combinados com a droga utilizada como moduladora.

Análise estatística

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata expressos como média. Para análise estatística foi aplicada a Two-way ANOVA seguida do teste de Tukey.

Resultados e discussão

Os resultados estão ilustrados na figura 1, onde a claritromicina teve resultado significativo quando utilizada como agente modulador do imipenem (Cla/Imi) podendo ser visto o efeito sinérgico em todas as linhagens de bactérias utilizadas nesse estudo, uma vez que o uso isolado de imipenem requereu uma concentração deste antibiótico de 102 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para haver a morte das linhagens de SA e EC, respectivamente, enquanto

que sua associação com claritromicina reduziu tais concentrações para a 10 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Já diante do uso do imipenem modulando a claritromicina (Imi/Cla) a redução da claritromicina na linhagem de SA se deu de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e na linhagem de EC a redução foi de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Com isso, foi constatado um efeito antibacteriano aumentado com os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*.

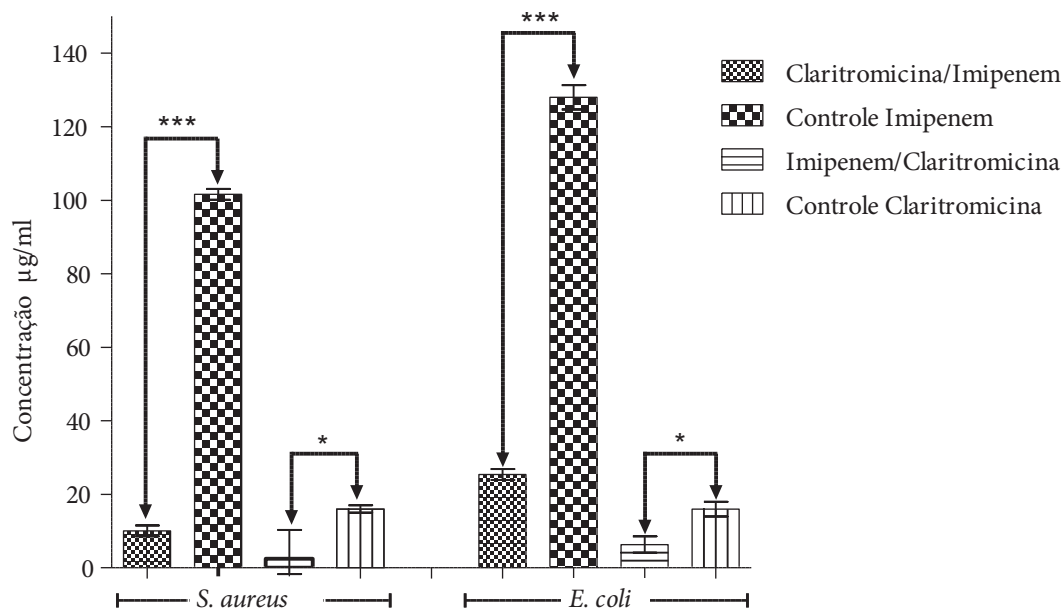


Figura 1: Atividade moduladora entre claritromicina e imipenem contra linhagens de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC).

*** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$; ns – não estatisticamente significativo com $p > 0,05$.

Os resultados ilustrados na figura 2 mostram que a claritromicina, quando usada como agente modulador do ciprofloxacino (Cla/Cipro). O efeito sinérgico da droga na linhagem SA não teve significância, porém houve resultado antibacteriano aumentado frente a linhagens bacteriana de EC, com uma redução de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quando isolado, para 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em associação.

Também foi testado o ciprofloxacino modulando a claritromicina (Cipro/Cla) e, nesse caso,

foi constatado um efeito sinérgico significativo frente aos microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, onde no primeiro a redução da CIM foi de 52 para 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e no segundo de 35 para 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A figura 3 mostra o efeito modulador da interação entre antibióticos, quando avaliados contra cepas bacterianas. Nos testes frente à cepa bacteriana Gram-negativa multirresistente *E. coli* 27, as duas drogas testadas tiveram uma melhor atuação no CIM por associação, sugerindo

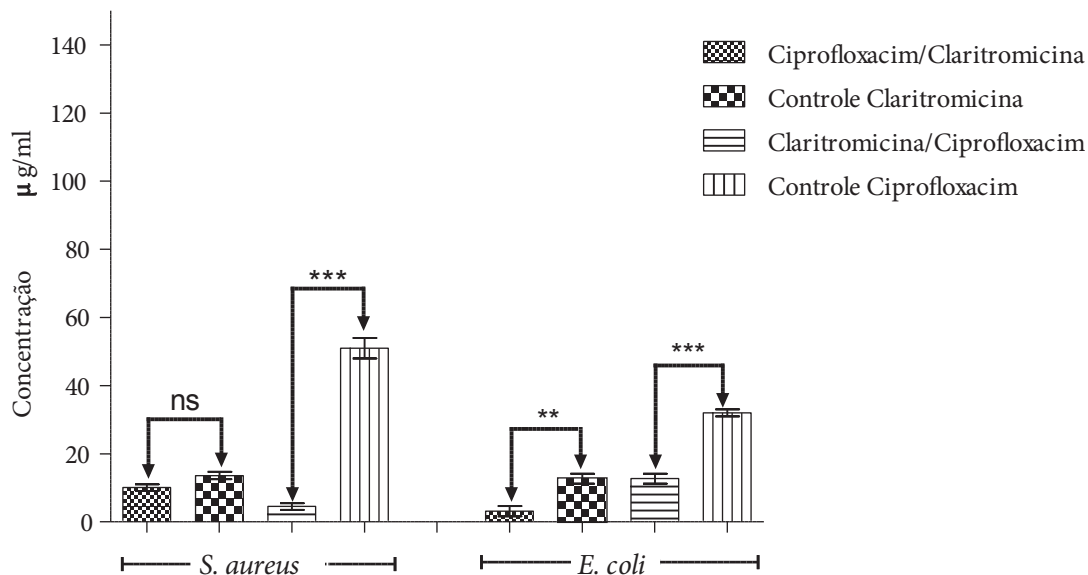


Figura 2: Atividade moduladora entre claritromicina e ciprofloxacino contra linhagens de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichia coli* (EC).

*** valor estatisticamente significante com $p < 0,0001$; ns – não estatisticamente significante com $p > 0,05$.

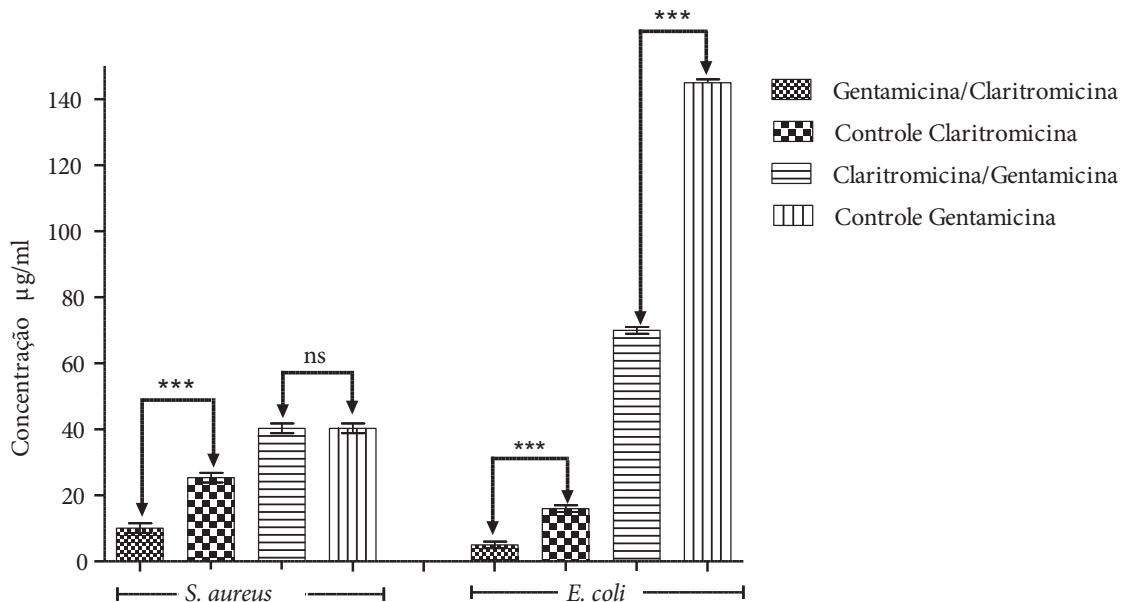


Figura 3: Atividade moduladora entre claritromicina e gentamicina contra linhagens de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Escherichiacoli* (EC).

*** valor estatisticamente significante com $p < 0,0001$; ns – não estatisticamente significante com $p > 0,05$.

uma relação de sinergismo. Quando a droga moduladora foi a gentamicina, a redução da CIM foi de 15 µg/mL para 5 µg/mL; quando usada a claritromicina como moduladora, a redução foi de 33 µg/mL para 15 µg/mL.

Os efeitos de tais antibióticos sobre as linhagens de SA foram menos expressivos, principalmente quando a droga moduladora foi a claritromicina, uma vez que o resultado não teve significância. Quando a gentamicina foi modulada, a redução da CIM se deu de 25 µg/mL para 10 µg/mL.

Nos últimos anos, tem havido grande empenho científico em pesquisas químicas e farmacológicas sobre as propriedades biológicas de plantas medicinais (16). Outra alternativa para os tratamentos diz respeito à associação de antimicrobianos, em casos particulares, com a finalidade de se alcançar uma ação sinérgica ou um aumento do potencial de ação dos mesmos, alargando seu espectro de atividade, além de se evitar a utilização de monoterapia antimicrobiana, devido ao risco de desenvolvimento de resistência em determinados casos (17). Vale ressaltar ainda que a associação dessas drogas, as quais devem ter ação bactericida, mecanismo de ação diferente, espectro específico e menor custo, facilitam também o cumprimento da terapêutica por parte do paciente.

Portanto, a utilização de terapia combinada com duas ou mais classes de medicamentos é mais eficaz do que o uso de altas doses de monoterapia (18, 19). Tais dados reafirmam os resultados encontrados em nosso trabalho, onde a associação entre medicamentos mostrou-se mais eficaz que o uso de antibióticos individualmente.

A claritromicina, pertence à classe dos macrolídeos, liga-se reversivelmente à subunidade 50S inibindo o processo de transpeptidação e translocação. O peptídeo é liberado prematuramente e incompleto perdendo sua função celular (20).

Os mecanismos através dos quais algumas linhagens bacterianas tornam-se resistentes aos macrolídeos geralmente envolvem um destes três a seguir: alterações no alvo da droga, efluxo e inativação. As modificações no alvo da droga conferem um amplo espectro de resistência aos macrolídeos, o efluxo e a inativação afetam apenas alguns desses antimicrobianos (21).

Os β-lactâmicos, classe na qual o imipenem está inserido, inibem as enzimas transglicosidases que participam na formação, manutenção e regulação da matriz do peptidoglicano. Estas enzimas são as PBPs (*Penicilin Binding Proteins*) localizadas na superfície da membrana citoplasmática (22). A ligação do β-lactâmico às PBPs impede a bactéria de completar a transpeptidação das ligações do peptidoglicano, evitando a síntese da parede celular (23).

A perda da sensibilidade ao imipenem pode ser proveniente, por exemplo: da diminuição da permeabilidade da membrana externa aos antimicrobianos, igualmente conhecida como perda de porinas; da presença de PBPs com baixa afinidade por carbapenêmicos; da superexpressão de bombas de efluxo; ou ainda da produção de enzimas, conhecidas como carbapenemases, capazes de hidrolisar estes agentes antimicrobianos (24).

As Fluoroquinolonas começaram a ser prescritas mais frequentemente para o tratamento de infecções em pacientes ambulatoriais, de forma massiva e indiscriminada desde a sua introdução comercial. Isso levou a um aumento das infecções causadas por *E. coli* resistente as Fluoroquinolonas, dificultando seu tratamento (25). Conforme apontado nesse estudo, o uso do ciprofloxacino individualmente mostrou um alto índice de resistência dos microorganismos testados.

Estudos anteriores demonstraram alta resistência individual verificada em *S. aureus* e *E. coli* em relação ao ciprofloxacino, a exemplo: (53,1 %), (22,15 %), (21,3 %), configurando-se

ainda como um dos mais altos perfis de resistência entre os antimicrobianos, devendo portanto, ser revista a sua utilização como primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por tais agentes etiológicos (26-28).

Os aminoglicosídeos são usados, primordialmente, para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos aeróbicos ou em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular contra algumas bactérias Gram-positivas resistentes, como por exemplo, penicilina, vancomicina, macrolídeos (29).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são distribuídas na natureza assim como na microbiota normal da pele e na mucosa dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e inclusive em humanos (2, 30).

Neste trabalho foram selecionados os fármacos acima citados, utilizados em tratamento

de enfermidades causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. A CIM de cada um deles foi avaliada e posteriormente testes de modulação foram realizados para avaliar possíveis efeitos sinérgicos na sua combinação.

Conclusão

Observou-se que, em algumas situações, a associação entre antibióticos demonstrou efeitos sinérgicos e conseqüentemente diminuição da resistência microbiana. Tal evento, possivelmente, deve-se ao fato de alguns dos antibióticos agirem em alvos diferentes, melhorando a capacidade antibacteriana.

Porém a literatura carece de informações adicionais acerca de tal prática, o que reforça a necessidade de mais estudos como este para subsidiar o uso de antibióticos em associação e analisar futuramente seus efeitos como alternativa para diminuir o alto índice de resistência aos antibióticos atualmente comercializados.

Referências

1. Silveira GPF, Gesser JC, Sá MM, Terenzi H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Quim Nova*. 2006;29(4):844-55.
2. Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;230:191-95.
3. Georgopadakou NH. Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. *Drug Resist Updat*. 2005;5:181-91.
4. Dancer SJ. The problem with cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:463-78.
5. Coutinho HDM, Cordeiro LD, Bringel KP. Resistência a antibióticos de bactérias patogênicas isoladas da população de Juazeiro do Norte - Ceará. *Rev Bras Ciên Saúde*. 2005;9:127-38.
6. File Jr TM. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. *Ple Chest*. 2000;2(1):3-8.
7. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. A atividade anti-estafilocócica *in vitro* de *Hyptis martiusii* Benth contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina MRSA. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2008;18:670-75.
8. Canton M, Onofre SB. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. *Rev bras farmacogn* 2010;20(3):348-54.
9. Paina FA. Efeitos da Clofazimina e Claritromicina sobre os sistemas hematológicos, hemostático e bioquímico de ratos Wistar [tese]. [Ribeirão Preto (SP)]: Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-28032012-152743/pt-br.php> Universidade de São Paulo; 2011.

10. Neves AM. Odontogeriatría: interações medicamentosas [tese]. [Conselheiro Lafaiete (MG)]: Disponible en: http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_arquivos/26/TDE-2008-02-19T112600Z-1298/Publico/CARLABAGGIO.pdf Universidade Federal de Minas Gerais; 2011. 29 p.
11. Baggio CL. Análise microscópica das células ciliadas externas no uso da gentamicina [tese]. [Santa Maria (RS)]: Universidade Federal de Santa Maria; 2007. 63 p.
12. Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Revista Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2006;21(4):444-52.
13. Souza-Mello MR. Detecção da atividade da enzima carbapenemase em Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil [tese]. [Brasília (DF)]: Disponible en: http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16363/1/2014_ManuelaRodriguesDeSouzaMello.pdf Universidade de Brasília; 2014, 20 p.
14. Oliviveira HC. Guia prático das interações medicamentosas dos principais antibióticos e antifúngicos utilizados no hospital universitários Júlio Muller. Centro de Informação sobre Medicamentos - CIM/MT- HJUM/ SES. Cuaibá- MT; 2009.
15. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* . 1996;39:3107-13.
16. Coutinho HDM, Costa, JGM, Lima, EO, Siqueira-Júnior JP. Anti-staphylococcal activity of *Eugenia jambolana* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Properties*. 2010;13(6):1405-10.
17. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Nota Técnica N.º 1/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília: ANVISA; 2013.
18. Brandão AA, Campana EMG, Magalhães MEC, Pozzan R, Brandão AP. Combinação de Fármacos anti-hipertensivos na síndrome metabólica. *Revista Factores de Risco*. 2011;22:36-9.
19. Scala LCN, Póvoa R. Combinação de fármacos anti-hipertensivos na diabetes mellitus. *Revista Factores de Risco*. 2011;22:44-9.
20. Menezes EA, Soares KP, Nascimento KM, Amorim LN, Neto JGL, Cunha FA. Macrolídeos: uma atualização. *NewsLab*. 2007;85:116-26.
21. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, et al. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria spp.* carry known rRNA methylase genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1367-72.
22. Anglada RR. Microbiología Sanitaria y Clínica. Madrid: Editorial Síntesis; 1997.
23. Zhanel GG, Ryan W, Leanne D, Kristjan T, Ethan R, Daryl JH, et al. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
24. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase from a Nosocomial Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(1):84-5.
25. Costa LC, Belém LE, Silva PME, Pereira HS, Silva Júnior ED, Leite TR, et al. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. *Rev bras anál clín*. 2010;42(3):175-80.
26. Kobayashi CCBA, Sadoyama G, Vieira JDG. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(4): 404-10.
27. Oliveira FA, Nogueira KS. Resistência a fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas em cultura de urina. *Rev bras anál clín*. 2011;43(2):152-54.

28. Menezes KMP, Goís MAG, Oliveira ID, Pinheiro MS, Brito AMG. Avaliação da resistência da *Escherichia coli* frente à Ciprofloxacina em uroculturas de três laboratórios clínicos de Aracaju-SE. *Rev bras anál clín* 2009;41(3):239-42.
29. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; *Approved Standard 6*.th. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
30. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Jr JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2009;54:328-30.