

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

**Heterorresistência e resistência adaptativa à Polimixina B em  
isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de *Klebsiella  
pneumoniae* carbapenemase (KPC)**

DANIELA INOCENTE LUZ

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Heterorresistência e resistência adaptativa à Polimixina B em  
isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de *Klebsiella  
pneumoniae* carbapenemase (KPC)**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn  
Zavascki

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

DANIELA INOCENTE LUZ

Porto Alegre

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Luz, Daniela Inocente

Heterorresistência e resistência adaptativa à polimixina B em isolados de Enterobacteriaceae produtores de Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) / Daniela Inocente Luz. -- 2014.

63 f.

Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Enterobactérias. 2. Polimixina B. 3. Heterorresistência. 4. Resistência adaptativa. I. Zavascki, Alexandre Prehn, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Zavascki, pela oportunidade, pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança. Muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciência Médicas pela oportunidade de realizar este curso

Às colegas e grandes amigas, Laura Czekster Antochewis, Cibele Magagnin e Fabiane Jamono Vieira, pela enorme dedicação, pelo auxílio para a realização dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio e colaboração.

Com muito carinho, agradeço ao Robson França Silva, pelo amor, companheirismo e incentivo, e pelo nosso maior presente, o Theo.

E, por fim, agradeço à minha família, meus pais Angela e Flavio, e minha irmã Gabriela por todo o carinho, mas com agradecimento especial a minha mãe, meu grande exemplo de vida e minha maior incentivadora, a quem dedico todas as minhas conquistas.

## RESUMO

As enterobactérias constituem importantes agentes causadores de infecções nosocomiais e possuem alta capacidade em adquirir mecanismos de resistência, inclusive aos carbapenêmicos, que são os principais fármacos utilizados para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos. Assim, as opções terapêuticas tornaram-se restritas e as polimixinas (polimixina B e colistina) voltaram a ser utilizadas na prática clínica. Estudos descrevem a ocorrência de heterorresistência à colistina em enterobactérias. Para a resistência adaptativa, não há relatos atuais para enterobactérias frente à polimixina B. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença destes dois fenômenos de resistência à polimixina B, e sua estabilidade, em isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), provenientes de pacientes hospitalizados. A avaliação da heterorresistência foi feita através da análise do perfil populacional (PAP) em 8 isolados de enterobactérias, inoculando-se diluições seriadas dos mesmos em Agar Mueller Hinton contendo diferentes concentrações de polimixina B. Os ensaios de resistência adaptativa foram realizados para os mesmos isolados, submetendo-os ao cultivo em concentrações crescentes de polimixina B. A determinação da estabilidade das subpopulações resistentes foi feita através de passagens dos isolados, por 4 dias consecutivos, em meio livre de antibiótico, e posterior determinação da CIM. A CIM foi reavaliada após 2 e 6 meses de estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$  para os isolados com subpopulações heterorresistentes ou com resistência induzida. Realizou-se técnica de tipagem molecular (PFGE), entre as populações originais e respectivas subpopulações resistentes. Foram avaliados 4 isolados de *Klebsiella pneumoniae* caracterizadas como 4 clones distintos (K1, K2, K3 e K4), assim como os 3 isolados de *Enterobacter cloacae* - 2 de clone idêntico (Ec1a e Ec1b), mas com perfis fenotípicos distintos e um clonalmente distinto (Ec2), e uma cepa de *Escherichia coli* (E1). As CIM iniciais para polimixina B, realizadas por microdiluição em caldo, foram entre 0,0625 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . Quatro amostras demonstraram heterorresistência (K1, K2, K3 e K4), as quais cresceram nas concentrações 2 (K2), 3 (K1, K4) e 6  $\mu\text{g/mL}$  (K3), e suas CIM após 4 dias de passagem em meio livre de antibiótico se mantiveram altas (K1 4  $\mu\text{g/mL}$ , K2 e K3 16  $\mu\text{g/mL}$  e K4 2  $\mu\text{g/mL}$ ). As subpopulações heterorresistentes representaram

0,000087% a 0,00036% de suas populações originais. Três amostras demonstraram resistência adaptativa (K1, K3 e K4), as quais cresceram até concentração 64 µg/mL de polimixina B, e a CIM após 4 dias de passagem em meio livre de antibiótico foi de 32 µg/mL para os três isolados. As CIM mantiveram-se elevadas após 2 e 6 meses de estocagem, tanto para os isolados heterorresistentes como para aqueles da indução da resistência. Por PFGE, verificou-se a relação clonal entre os isolados clínicos iniciais e as subpopulações resistentes. Dos 8 isolados estudados, 4 apresentaram heterorresistência e 3 apresentaram resistência adaptativa. A avaliação da CIM após 2 e 6 meses demonstrou estabilidade das subpopulações, sugerindo o envolvimento de mecanismos moleculares para ambos os fenômenos. Estudos moleculares devem ser realizados para melhor avaliação da heterorresistência e da resistência adaptativa, e melhor compreensão do significado clínico e implicações terapêuticas destes dois fenômenos.

**Palavras-chave:** enterobactérias, polimixina B, heterorresistência, resistência adaptativa.

## ABSTRACT

*Enterobacteriaceae* representants are important agents of nosocomial infections and have high capacity to acquire mechanisms of resistance, including carbapenems, which are the major drugs used for the treatment of infections caused by these microorganisms. Thus, treatment options become limited and polymyxins (polymyxin B and colistin) were again used in clinical practice. Studies describe the occurrence of heteroresistance to colistin in *Enterobacteriaceae*. For adaptive resistance, there are no current reports for those microorganisms front of polymyxin B. The purpose of this study was to evaluate the presence of these two phenomena of resistance to polymyxin B, and its stability in isolates of *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing, from hospitalized patients. The evaluation of heteroresistant was made by examining the population profile (PAP) of 8 isolates of enterobacteria inoculating serial dilutions thereof in Mueller Hinton agar containing different concentrations of polymyxin B. The adaptive resistance tests were performed for the same isolates by subjecting them to growing in increasing concentrations of polymyxin B. The determination of the stability of resistant subpopulations was performed after daily sub-cultured in antibiotic-free medium for 4 consecutive days, and subsequent determination of MIC. MICs were reevaluated after 2 and 6 months of storage at -80 ° C for the isolated subpopulations with heteroresistant or induced resistance. We conducted molecular typing technique (PFGE), between the original and resistant subpopulations respective populations. Were evaluated four isolates of *Klebsiella pneumoniae* characterized as 4 different clones (K1, K2, K3 and K4), as well as the three isolates of *Enterobacter cloacae* - 2 identical clone (EC1A and Ec1b), but with different and distinct phenotypic profiles (Ec2) and a strain of *Escherichia coli* (E1). The initial MICs for polymyxin B, performed by broth microdilution, were between 0.0625 and 0.25 µg/mL. Four samples showed heteroresistance (K1, K2, K3 and K4), which grew at concentrations 2 (K2), 3 (K1, K4) and 6 µg/ml (K3), and their MIC after 4 days passage in antibiotic-free medium remained high (K1 4 µg/mL, K2 and K3 16 µg/mL and K4 2µg/mL). The heteroresistant subpopulations represent 0.000087% to 0.00036% of their original populations. Three samples showed adaptive resistance (K1, K3 and K4), which growth in polymyxin B concentration of 64 µg/mL and MIC after 4 days passage in

antibiotic-free medium was 32 µg/ml for all three isolates. MICs remained elevated after 2 and 6 months storage, both isolates heteroresistant as those inducing resistance. By PFGE, we evaluated the clonal relationship between the initial clinical isolates and resistant subpopulations. From the 8 isolates studied, 4 isolates demonstrated heteroresistance and 3 showed adaptive resistance. The evaluation of the MIC after 2 and 6 months showed stability of subpopulations, suggesting the involvement of molecular mechanisms for both phenomena. Molecular studies should be conducted to better evaluation of heteroresistance and adaptive resistance, and understanding of clinical significance and therapeutic implications of these phenomena.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, polymyxin B, heteroresistance, adaptive resistance.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da Polimixina B.....	19
--	----

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Table 1.</b> Results of population analysis profile (PAP) of KPC-2-producing <i>Enterobacteriaceae</i> isolates to polymyxin B.....	58
<b>Table 2.</b> Results of adaptive resistant to polymyxin B experiments of KPC-2-producing <i>Enterobacteriaceae</i> isolates .....	59

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>bla</i> <sub>KPC-1</sub>	Gene da carbapenemase KPC-1
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Gene da carbapenemase KPC-2
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L-Ara4N	L-4-amino-4-deoxi-L-arabinose
LPS	Lipopolissacarídeos
MH	Mueller-Hinton
PAP	Perfil de Análise Populacional
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	14
2.2 Microrganismos Gram-negativos .....	14
2.3 Enterobactérias e carbapenemases.....	15
2.4 Polimixinas.....	19
2.5 Mecanismos de resistência às polimixinas.....	21
2.6 Heterorresistência.....	24
2.7 Resistência adaptativa.....	28
3 JUSTIFICATIVA .....	31
4 OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo principal.....	32
4.2 Objetivos secundários.....	32
5 REFERÊNCIAS .....	33
6 ARTIGO EM INGLÊS (A ser submetido ao <i>Journal of Medical Microbiology</i> ) .....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* é um grupo heterogêneo de microrganismos, muitos dos quais fazem parte da microbiota normal do ser humano. Entretanto, são os microrganismos mais frequentemente isolados em infecções humanas, principalmente em ambientes hospitalares (1). Dentre os diversos representantes das enterobactérias, *Klebsiella pneumoniae* destaca-se como um importante patógeno associado a infecções comunitárias e nosocomiais (2).

A urgência no tratamento de infecções graves causadas por microrganismos multidroga resistentes resultou no uso aumentado de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente os carbapenêmicos. Devido ao uso intenso destes antibióticos, surgiram as enterobactérias e outros importantes patógenos resistentes a estes antimicrobianos, causando um problema de saúde pública mundial (3, 4).

Como um dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, destacam-se as carbapenemases, enzimas capazes de conferir resistência a praticamente todos os todos os antibióticos beta-lactâmicos (5, 6). Dentro das enterobactérias, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é uma das principais enzimas responsáveis pela resistência destes microrganismos aos carbapenêmicos (7, 8).

Com a emergência dos microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, as polimixinas, as quais não eram mais utilizadas desde os anos 1970 pela sua toxicidade (9), voltaram a ser opção terapêutica, principalmente em infecções causadas por Gram-negativos em pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva, e pela carência de novos fármacos para combater esses microrganismos (10).

As taxas de resistência às polimixinas ainda são consideradas baixas (11). No entanto, entre as enterobactérias já são descritos casos de resistência a esses antibióticos, principalmente à colistina e em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (12, 13). Assim, compreender os mecanismos envolvidos na resistência a estes antibióticos torna-se de extrema importância, sejam eles mecanismos intrínsecos ao microrganismo ou adaptativos (14).

A heterorresistência é um fenômeno que se caracteriza pelo crescimento de subpopulações bacterianas resistentes em meio a uma população sensível a um determinado antimicrobiano. Para enterobactérias, este fenômeno tem sido descrito principalmente para a colistina e carbapenêmicos (13, 15-18). No entanto, o significado clínico da heterorresistência ainda não está bem elucidado, embora esteja relatado que este fenômeno possa estar associado ao desenvolvimento, posterior, de isolados totalmente resistentes ou na falha terapêutica (19).

A resistência adaptativa é um fenômeno autorregulado, que se caracteriza pela rápida indução de resistência na presença do antimicrobiano e posterior reversão ao fenótipo sensível na sua ausência. Diferente da resistência genética, a qual é estável pelo surgimento de mutação cromossômica ou aquisição de elemento genético, a resistência adaptativa demonstra-se instável e reversível (20). Resistência adaptativa à polimixina B tem sido descrita em importantes patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (20-22).

Não há muito entendimento sobre heterorresistência e resistência adaptativa para enterobactérias frente à polimixina B. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a ocorrência destes dois fenômenos, para este antibiótico, em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão de literatura apresenta os principais aspectos relacionados às enterobactérias produtoras de carbapenemases e dois fenômenos de resistência: a heterorresistência e a resistência adaptativa. São apresentadas, também, informações sobre as polimixinas, bem como mecanismos de resistência a estes antimicrobianos e que podem estar relacionados à ocorrência desses fenômenos.

A estratégia de busca utilizou a base de dados PubMed e o banco de teses CAPES, sem limitação dos períodos de busca.

As principais estratégias de busca utilizaram os termos “(*polymyxin OR colistin OR polymyxins*) AND (*hetero-resistance OR hetero-resistant OR heteroresistance OR heteroresistant OR adaptive OR inductive*)” e “(*polymyxin [ti] OR colistin [ti] OR polymyxins[ti]*) AND (*resistance OR resistant*) AND (*enterobacteriaceae [ti] OR klebsiella [ti] OR enterobacter [ti] OR escherichia [ti]*)”.

Utilizando a primeira estratégia de busca, foram localizadas 85 publicações e destas, 33 foram avaliadas e 21 foram utilizadas na revisão. A segunda estratégia localizou 142 artigos, sendo que 75 foram selecionados para serem avaliados e 19 foram usados na revisão. A partir dos estudos selecionados, diversos outros artigos de interesse foram localizados e utilizados nesta revisão.

### 2.2 Microrganismos Gram-negativos

Os microrganismos Gram-negativos englobam um grande número de famílias bacterianas. Dentre os representantes deste vasto grupo, encontram-se importantes

patógenos, como a família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (6).

Os microrganismos Gram-negativos possuem uma parede celular mais complexa em relação às bactérias Gram-positivas, tanto química quanto estruturalmente. Diferentemente das Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa à parede celular, a qual mantém a estrutura bacteriana e funciona como uma barreira de permeabilidade a grandes moléculas e moléculas hidrofóbicas, incluindo alguns antimicrobianos (6).

A membrana externa é dividida em duas camadas: a monocamada interna, composta por fosfolipídeos, e a externa, na qual são encontrados lipopolissacarídeos (LPS), os quais são estimuladores da resposta imune. Esta membrana é mantida por ligações de cátions divalentes, como o magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e cálcio ( $Ca^{2+}$ ), entre os fosfatos dos LPS e as interações hidrofóbicas entre os LPS e as proteínas (6).

Os LPS consistem de três seções estruturais: lipídio A, núcleo polissacarídico e antígeno O, sendo o lipídio A um componente básico dos LPS e essencial para a viabilidade bacteriana (6, 23). O lipídio A possui em esqueleto dissacarídeo glicosamina fosforilado, com ácidos graxos ligados para ancorar a estrutura da membrana externa. Grupos fosfato conectam as unidades de LPS em agregados. A estrutura do lipídio A é usada na classificação das bactérias Gram-negativas, sendo semelhante para todos os membros da família *Enterobacteriaceae* (6).

### **2.3 Enterobactérias e carbapenemases**

A família *Enterobacteriaceae* é caracterizada como o maior e mais heterogêneo grupo de bacilos Gram-negativos de importância clínica, composta por cerca de cinquenta gêneros e centenas de espécies e subespécies. Os representantes desta família compartilham um antígeno comum e podem ser móveis ou imóveis. Não formam esporos e podem crescer rapidamente aeróbica e anaerobicamente em uma variedade de meios. São bactérias que possuem



necessidades nutricionais simples, fermentam glicose, reduzem o nitrato e são catalase positivas e oxidase-negativas (6).

Estes microrganismos fazem parte da microbiota intestinal e são as bactérias mais frequentemente isoladas em infecções humanas (1). Dentre os diversos gêneros e espécies desta família, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, encontram-se entre as mais comumente isoladas (24). *Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno relacionado a infecções comunitárias e hospitalares (2).

Até metade da década de 90, a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de AmpC representavam os principais mecanismos de resistência entre os isolados de enterobactérias, sendo raros os relatos de resistência aos carbapenêmicos nessa família (3). Entretanto, pela urgência clínica no tratamento de infecções hospitalares, muitas vezes são utilizados potentes antimicrobianos de amplo espectro antes de serem conhecidos os resultados dos testes de sensibilidade (25). Incluídos nos antimicrobianos de amplo espectro, encontram-se os carbapenêmicos, os quais têm sido largamente utilizados no tratamento de infecções severas causadas por cepas bacterianas multidrogas resistentes (16, 26). Este aumento da utilização dos carbapenêmicos nas últimas décadas levou ao surgimento de resistência a esses antibióticos, configurando um problema de saúde pública em diversos países (3, 4).

A resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos pode envolver a combinação de vários mecanismos, entre eles: modificações na permeabilidade da membrana externa e na regulação dos sistemas de efluxo, em associação com hiperprodução de AmpC beta-lactamases ou ESBL; ou produção de beta-lactamases específicas na hidrólise de carbapenêmicos, as carbapenemases (27).

É preocupante a emergência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, principalmente no ambiente hospitalar (27, 28), e a produção de carbapenemases representa um dos principais mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos nestes microrganismos, resultando em concentrações inibitórias mínimas (CIMs) elevadas para estes antibióticos. Entretanto, as metodologias padronizadas para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

utilizadas na rotina laboratorial, como as descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (29), não são capazes de identificar mecanismos de resistência, e estes muitas vezes requerem técnicas moleculares para serem identificados (28).

O aumento da resistência entre os microrganismos Gram-negativos, incluindo os membros da família *Enterobacteriaceae*, faz com que o número de opções terapêuticas eficazes para tratar as infecções causadas por esses patógenos torne-se cada vez menor (27, 30, 31), e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ainda é limitado (30). As infecções causadas por isolados Gram-negativos multidrogas resistentes são associadas a aumento de custos, bem como aumento do tempo de hospitalização, além do incremento das taxas de morbidade e mortalidade (32).

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, são encontradas diversas carbapenemases, sendo a KPC uma das principais enzimas responsáveis pela resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos (7, 8). As carbapenemases apresentam um espectro de ação abrangente em relação a outras beta-lactamases, e conferem resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (5, 6).

Embora o termo KPC esteja associado à espécie bacteriana onde a enzima foi isolada e caracterizada pela primeira vez (33), essa denominação é comumente utilizada para descrever a presença da enzima independentemente da espécie, considerando que a mesma já foi identificada em grande parte dos membros da família *Enterobacteriaceae* (34-38). As enzimas do tipo KPC já foram encontradas, também, em espécies Gram-negativas não-fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (39-42).

As beta-lactamases do tipo KPC são enzimas plasmídeo mediadas (8, 43), e, entre as enterobactérias, *Klebsiella pneumoniae* é a espécie citada como a maior produtora de carbapenemase no mundo (8, 16), sendo um importante patógeno causador de infecções graves (16).

As enzimas do tipo KPC estão incluídas dentro da classe das chamadas carbapenemases classe A. Nesta classificação, as carbapenemases estão divididas

em cinco grupos, KPC, GES, SME, IMI e NMC-A, com base nas características filogenéticas das enzimas (44, 45).

Yigit e colaboradores foram os primeiros a isolar e caracterizar esta nova classe de carbapenemases, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, a qual foi identificada como KPC-1, na Carolina do Norte, nos Estados Unidos (33). A partir deste relato, foram descritos casos de outra variante de KPC, diferente de KPC-1 em um aminoácido, a KPC-2, em pacientes hospitalizados nos Estados Unidos (37, 46, 47). Posteriormente, a partir de um novo sequenciamento, verificou-se que não havia distinção entre os genes *bla*<sub>KPC-1</sub> e *bla*<sub>KPC-2</sub>, sendo as carbapenemases KPC-1 e KPC-2 idênticas (48).

Além de KPC-1/KPC-2, outras variantes de carbapenemases do tipo KPC já foram isoladas e caracterizadas (KPC-3 até KPC-22), as quais diferem de KPC-1/KPC-2 pela substituição de, no máximo, dois aminoácidos (27, 39, 49-53).

Desde então, relatos de representantes da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos têm sido reportados mundialmente (7, 30, 54), e as enzimas carbapenemases do tipo KPC constituem um problema de saúde pública (31, 55). A rápida disseminação de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos tem feito com que cuidados comuns com a saúde transformem-se em infecções complicadas, não tratáveis com os antimicrobianos disponíveis (56).

Em 2009, foi publicado o primeiro relato no Brasil de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos produtoras de carbapenemases do tipo KPC, em isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de pacientes hospitalizados no ano de 2006 (26). Entretanto, as primeiras evidências de enterobactérias produtoras de carbapenemases no Brasil são de isolados recuperados de 2005 (57). Desde então, outros relatos de isolados de enterobactérias produtores de KPC têm sido descritos em todo país (58-60).

No ano de 2010, houve uma grande dispersão do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> no país, e isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi observada em vários hospitais em diversos locais do território brasileiro (59).

## 2.4 Polimixinas

As polimixinas são antibióticos polipeptídeos cíclicos, derivados de *Bacillus polymyxa*, com forte ação sobre diversos microrganismos Gram-negativos, e foram disponibilizados pela primeira vez para uso terapêutico na década de 50 (6, 61). Entre os anos de 1970 e 1980, esta classe de antimicrobianos deixou de ser utilizada, devido a sua toxicidade e pelo surgimento de fármacos mais potentes e menos tóxicos (9).

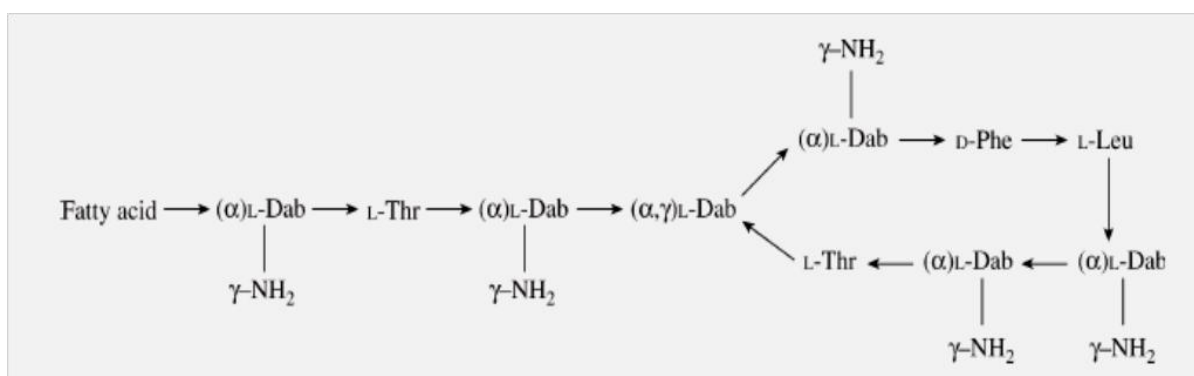
Esta classe de antibióticos é composta por um grupo de cinco diferentes polimixinas: A, B, C, D e E. Porém, somente as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente (62), pois as restantes têm uma grande toxicidade. A polimixina E é também chamada de colistina, sendo derivada do *Bacillus colistinus* (63).

A estrutura básica da polimixina B é constituída por um anel peptídico policatiônico e uma cadeia lateral tripeptídica com um ácido graxo na porção final (64). A polimixina B é uma mistura de, pelo menos, quatro componentes relacionados: polimixina B1 (ácido 6-metiloctanoico), polimixina B2 (ácido 6-metilheptanoico) e polimixinas B3 e B4, os quais diferem entre si pela cadeia de ácido graxo, sendo B1 e B2 os constituintes majoritários (Figura 1) (65, 66). Entre as estruturas da polimixina B e da colistina, há apenas um aminoácido de diferença (67).

A poliximina B está disponível para uso parenteral sob a forma de sulfato de polimixina B (68). A colistina está disponível sob as formas de sulfato de colistina e metanossulfonato sódico de colistina, sendo administrada por via parenteral na forma de sal sódico de metanossulfonato de colistina, o qual é uma pró-droga inativa que sofre hidrólise *in vivo* e *in vitro* para liberar a colistina ativa (2, 69).

As polimixinas são antibióticos anfipáticos que atuam por desestabilização das membranas externa celular e citoplasmática da bactéria, e ligação aos componentes do conjunto celular, como os fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (6, 14). O anel peptídico policatiônico liga-se à membrana externa, por possuir afinidade

pelos LPS, deslocando, competitivamente, as pontes de cálcio e magnésio que estabilizam os LPS (64, 68, 70). A porção lipídica hidrofóbica pode ser considerada a parte mais potente da molécula de polimixina (71). As cadeias laterais de ácidos graxos também interagem com os LPS, contribuindo para a inserção das polimixinas na membrana externa (68). Assim, ocorre aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, levando à ruptura da mesma, com saída dos constituintes internos e consequente morte celular (6, 14).



**Figura 1.** Estrutura da Polimixina B. Ácido graxo: ácido 6-metiloctanoico para B1, ácido 6-metilheptanoico para B2, ácido octanoico para B3 e ácido heptanoico para B4. Thr: treonina; Leu: leucina; Dab: ácido alfa gama diaminobutírico; Phe: fenilalanina; onde  $\alpha$  e  $\gamma$  indicam o grupo amino envolvidos na ligação peptídica. FONTE: Adaptado de Zavascki *et al.*, 2007 (62).

A polimixina B não é capaz de agir sobre bactérias Gram-positivas e anaeróbias. No entanto, possui atividade contra diversos bacilos Gram-negativos, como as enterobactérias e outras espécies não-fermentadoras (63, 68, 70-72). Patógenos importantes, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., comumente são sensíveis à polimixina B, incluindo isolados resistentes a diversas outras classes de antimicrobianos (72). Dentro da família *Enterobacteriaceae*, diversos representantes costumam ser suscetíveis à polimixina B, entre eles *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Klebsiella* spp. (72, 73).

A avaliação do perfil de suscetibilidade *in vitro* para a polimixina B é feita pelo método de microdiluição em caldo, através da determinação da CIM. Ainda não há padronização para avaliação do perfil de suscetibilidade a este antibiótico pelo

método de disco-difusão para diversos microrganismos (29), provavelmente pela baixa difusão das polimixinas em ágar devido ao alto peso molecular das mesmas (71, 73). Ainda, a atividade das polimixinas *in vitro* pode ser afetada pela concentração de cátions presentes no ágar (72).

O CLSI não possui padronização para determinação da CIM para polimixina B para enterobactérias (29). Entretanto, a recomendação é que enterobactérias com CIM para polimixina B menor ou igual a 2 µg/mL sejam consideradas sensíveis, e CIM maior ou igual a 4 µg/mL, resistentes (74).

Na década de 90, começaram a surgir bactérias multirresistentes, incluindo enterobactérias produtoras de carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, resistentes aos beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (10, 14). Com isso, as polimixinas voltaram a ser opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por Gram-negativos, principalmente em pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva, e pela carência de novos fármacos para combater esses microrganismos (10).

## 2.5 Mecanismos de resistência às polimixinas

As polimixinas B e E são usadas como opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (10). Apesar de as taxas de resistência às polimixinas serem consideradas baixas (11), já são descritos casos de resistência a esses antibióticos, principalmente à colistina e em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (12, 13, 75-77), e a eficácia clínica destes antimicrobianos já está tornando-se limitada, principalmente quando são usados como monoterapia (56). Acredita-se que a exposição prévia às polimixinas e a utilização de doses abaixo das doses ideais sejam fatores importantes para que os microrganismos desenvolvam resistência a estes fármacos (13).

Na família *Enterobacteriaceae*, além de *Klebsiella* spp., a resistência à colistina está relatada para *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli* (13). Muitos dos casos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à colistina estão associados ao clone

epidêmico internacional ST258, o qual é o clone predominante entre os isolados desta espécie produtores de KPC (75-77).

Há vários mecanismos moleculares de resistência caracterizados para as polimixinas em diversas espécies bacterianas, e há resistência cruzada entre colistina e polimixina B (70). Embora estes mecanismos estejam bem caracterizados geneticamente, ainda falta conhecimento sobre as propriedades de superfície dos isolados resistentes a estes antimicrobianos, que impedem fisicamente a ligação da molécula de polimixina e impedindo a atividade bactericida (23).

Os microrganismos Gram-negativos, entre eles as enterobactérias, podem desenvolver resistência às polimixinas, principalmente por modificações da membrana externa bacteriana, através da alteração dos LPS, diminuindo ou impedindo a interação do antimicrobiano com os LPS (62, 71). A modificação dos LPS está relacionada a alterações de grupos fosfato do lipídio A pela adição de açúcares (71). As alterações de LPS podem resultar em uma redução da carga líquida negativa do lipídio A, diminuindo a interação das polimixinas com as bactérias. Assim, pode-se dizer que a modificação da carga da superfície bacteriana está envolvida com a resistência a estes antibióticos (62, 78).

Diversas espécies desenvolveram diferentes mecanismos de modificação do lipídio A com conseqüente redução da carga negativa (62). Uma das principais modificações do lipídio A, que confere resistência às polimixinas, está associada à adição do açúcar L-4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N), mediada pela enzima ArnA (79-81). *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Escherichia coli* realizam a modificação do lipídio A através da adição de L-Ara4N ou, também, pela adição de fosfoetanolamina (2, 82-84). Lacour e colaboradores sugerem que as expressões dos genes *etk* e *wzc*, que codificam tirosinas quinases, capazes de catalisar reações que podem ser essenciais para a biossíntese de L-Ara4N, possam estar envolvidas com a resistência às polimixinas (85, 86). As alterações nos LPS que causam resistência às polimixinas também podem ser mediadas pelas concentrações de ferro e por alterações no pH (87, 88).

A modificação dos LPS não é o único mecanismo de resistência às polimixinas (62). Para *Klebsiella pneumoniae*, está descrito que a resistência às

polimixinas pode ser dependente da presença de cápsula de polissacarídica bacteriana (89).

As alterações dos LPS são reguladas por dois sistemas majoritários de dois componentes: PhoPQ e PmrAB (71).

A resistência às polimixinas também já é descrita *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno que usualmente é suscetível a esses antimicrobianos (82). Nesta espécie, o sistema PmrAB parece ser o principal envolvido na regulação da resistência não só à polimixina B, mas a outros antibióticos catiônicos peptídicos. O locus *pmrAB* é o responsável por modular a adição de aminoarabinose ao lipídio A nesta espécie (82).

Em *Acinetobacter baumannii*, outro importante patógeno Gram-negativo, a resistência está associada com o aumento da expressão do operon *pmrCAB*, especialmente o gene *pmrC*, responsável por codificar a proteína que adiciona fosfoetanolamina ao lipídio A (90).

Em enterobactérias, grande parte dos estudos de resistência às polimixinas está voltada para *Klebsiella pneumoniae*, provavelmente pelos casos de resistência a estes antibióticos estarem descritos para esta espécie da família. Em *Klebsiella pneumoniae*, as modificações do lipídio A, a partir da adição de L-Ara4N, são reguladas pelos sistemas PhoPQ-PmrD e PmrAB, os quais são ativados em resposta ao baixo pH, baixas concentrações de magnésio e altas concentrações de ferro. O sistema PhoP/PhoQ, ou PhoPQ, está envolvido com a regulação do magnésio, podendo ativar a resistência à polimixina B em condições de baixas concentrações deste cátion. Este sistema PhoPQ está conectado por uma pequena proteína, a PmrD. PhoP regula a ativação de PmrD, que pode, então, se ligar a PmrA e prolongar o seu estado de fosforilação, ativando a expressão do sistema PmrA/PmrB, ou PmrAB, para promover a resistência à polimixina (91).

Estudos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à colistina avaliaram que a substituição de um aminoácido chave em PmrB foi responsável pelo fenótipo de resistência ao antibiótico, a partir da superexpressão dos operons *pmrCAB* e *pmrHFIJKLM* pela modificação de PmrB. Acredita-se que nesta espécie,



o sistema de regulação PmrAB possui um papel majoritário na resistência às polimixinas (92).

A exposição à polimixina nas diferentes fases de crescimento bacteriano pode alterar o padrão de expressão dos sistemas PhoPQ, PmrAB e PmrD, este último um conector que regula a expressão de *pmrAB*. Em *Klebsiella pneumoniae*, na presença de colistina, a expressão de *phoPQ* e *pmrD* diminuiu com o crescimento. Na ausência do antibiótico, houve as maiores expressões de *pmrAB*, *pmrD* e *phoPQ* durante a fase estacionária. Isso indica que a expressão dos sistemas regulatórios é modificada de acordo com a exposição ao antibiótico (78).

Os mecanismos subjacentes que regulam a resistência às polimixinas ainda não são totalmente esclarecidos (2). Análises genômicas sugerem que alterações do gene *mgrB*, suprarregulação do sistema PhoPQ, ativação do operon *pmrHFIJKLM* regulado por PmrA e a presença da aminotransferase ArnB, sejam mecanismos envolvidos com alterações nos LPS relacionados com a resistência às polimixinas em diversos patógenos, incluindo *Klebsiella pneumoniae* e outras enterobactérias (93-96).

Embora alterações no gene *mgrB* sejam comumente encontradas em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à colistina (12, 97, 98), Gaibani e colaboradores demonstraram que alguns destes isolados possuíam o gene *mgrB* com sua sequência completa, sugerindo que outros genes possam estar, também, envolvidos na resistência a este antibiótico (96).

## 2.6 Heterorresistência

A heterorresistência pode ser definida como a presença de subpopulações resistentes a um determinado antibiótico dentro de uma população sensível ao mesmo. Estas subpopulações são detectadas pelo crescimento de colônias bacterianas em meio de cultura contendo concentrações de antimicrobiano superiores às concentrações inibitórias mínimas iniciais daquele isolado.

Ainda, dentro de uma população sensível, pode-se encontrar subpopulações que apresentam CIMs superiores às CIMs originais, mas em valores que não consideram a subpopulação como resistente. Estas subpopulações podem ser chamadas de heterogêneas (99).

Os mecanismos envolvidos com o fenômeno da heterorresistência ainda são incertos, mas acredita-se que o aparecimento de subpopulações resistentes às polimixinas esteja relacionado com modificações nos LPS por diversas vias (2).

A emergência da heterorresistência é associada com a exposição a dosagens subinibitórias de polimixina e com a exposição prévia ao antimicrobiano. Entretanto, o significado clínico deste fenômeno ainda é incerto (71, 100).

Alguns autores afirmam que a ocorrência de heterorresistência pode ser um fenômeno não associado à exposição prévia à polimixina. Li e colaboradores encontraram subpopulações resistentes à colistina, em isolados de *Acinetobacter baumannii*, em pacientes que não haviam sido expostos previamente ao antimicrobiano (101).

Napier e colaboradores relatam que a heterorresistência a um antibiótico pode conferir resistência cruzada a um componente do sistema imune inato. Os autores verificaram que um isolado heterorresistente à colistina de *Enterobacter cloacae* apresentou resistência cruzada à lisozima do hospedeiro. Com isso, sugere-se que a heterorresistência a este antimicrobiano possa ter impacto no desfecho clínico, pois este fenômeno poderia interferir negativamente nas defesas imunes inatas (102).

Entre os isolados produtores de KPC, particularmente em *Klebsiella pneumoniae*, o aparecimento de cepas resistentes às polimixinas pode estar associado à presença de subpopulações heterorresistentes, as quais podem tornar-se rapidamente a população dominante e irreversivelmente resistente a estes antibióticos, tanto *in vitro* como *in vivo* (56). Uma das alternativas sugeridas para evitar falhas terapêuticas, pelo aparecimento destas subpopulações, é fazer uso de uma polimixina em combinação sinérgica com outro antimicrobiano. Combinações de colistina com rifampicina e colistina com doripenem mostraram eficazes em evitar

o aparecimento das subpopulações heterorresistentes de *Klebsiella pneumoniae in vitro* (56, 103).

A maioria dos estudos de heterorresistência às polimixinas avalia a presença de subpopulações resistentes frente à colistina. Estudos relatam a ocorrência do fenômeno de heterorresistência para este antibiótico em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter baumannii* (13, 15, 16, 102, 104-106).

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* demonstraram estabilidade das subpopulações heterorresistentes para a colistina. A proporção das subpopulações resistentes foi entre  $3,5 \times 10^{-5}$  a  $4,4 \times 10^{-7}$ , para os isolados provenientes de pacientes previamente expostos à colistina, e  $1,5 \times 10^{-5}$  a  $3,2 \times 10^{-7}$ , para os isolados sem exposição prévia (15).

Em *Acinetobacter baumannii*, está descrito o aparecimento de subpopulações heterorresistentes à colistina em uma frequência de  $1 \times 10^{-7}$ , para concentrações do antibiótico superiores a 6 µg/mL (106). Estudos anteriores verificaram proporções de subpopulações com heterorresistência estável à colistina de 0,000211% para este patógeno (100), embora os primeiros relatos de *Acinetobacter baumannii* com subpopulações resistentes a este antibiótico tenham encontrado frequências ente 0,00001 e 0,000001% (101).

Para a polimixina B, em enterobactérias, encontra-se descrita a ocorrência de subpopulações heterorresistentes em *Enterobacter spp.*, a partir de um estudo que comparou diferentes métodos para determinação da CIM dos isolados frente a este antimicrobiano. Neste estudo, os autores verificaram que a presença de subpopulações heterorresistentes interferiu na interpretação dos testes de suscetibilidade, levando a diferentes categorizações dos isolados, entre resistentes ou suscetíveis, quando comparados por diferentes métodos (107).

A presença de subpopulações heterorresistentes e com suscetibilidade heterogênea à polimixina B, apesar de incomum, também já foi observada em isolados *Pseudomonas aeruginosa*, com frequências das subpopulações entre  $2,1 \times 10^{-4}$  e  $6,9 \times 10^{-8}$  (99).

Em enterobactérias, já foi observada a ocorrência de heterorresistência para outras classes de antimicrobianos. A presença de subpopulações resistentes já foi relatada para *Klebsiella pneumoniae* frente aos carbapenêmicos imipenem e meropenem (17, 18). Para o imipenem, a análise do perfil populacional (PAP) encontrou proporções de subpopulações, que cresceram nas concentrações mais altas de antibióticos, variando entre  $3 \times 10^{-7}$  e  $5 \times 10^{-6}$  (17). Para o meropenem, as proporções variaram entre  $1,5 \times 10^{-8}$  e  $2,3 \times 10^{-5}$  (18). A heterorresistência aos carbapenêmicos foi associada a uma maior expressão do gene *bla<sub>KPC</sub>* das subpopulações resistentes quando comparadas às populações iniciais. Entretanto, esta expressão aumentada não demonstrou ser um fenômeno estável, pois as CIMs dos isolados heterorresistentes voltaram aos níveis originais após passagens diárias dos inóculos para meio livre de antibiótico (18).

A presença da heterorresistência dificilmente é detectada nas análises de rotina do laboratório de microbiologia. A determinação apenas da CIM inicial para um determinado isolado pode não ser o suficiente para detectar a ocorrência de subpopulações heterorresistentes e guiar o tratamento clínico adequado (15). A análise do perfil populacional é considerada referência para detecção de subpopulações heterorresistentes, embora seja uma técnica difícil de ser implementada na rotina laboratorial (13).

A presença de isolados heterorresistentes pode dificultar a interpretação de diferentes testes de suscetibilidade (107). Estudos que comparam diferentes testes, usados comumente na rotina, relatam que os métodos não são igualmente capazes de detectar as subpopulações resistentes. Muitas vezes, há discordância significativa nos valores de CIMs dos isolados quando testados por diferentes métodos, levando a categorizações distintas entre testes de sensibilidade (17, 25, 104). Os testes de suscetibilidade estão mais sujeitos a serem inadequadamente interpretados, pela presença destas subpopulações, quando são utilizados sistemas automatizados na rotina para determinação das CIMs (17, 18). Assim, torna-se importante o desenvolvimento de testes de suscetibilidade que sejam capazes de detectar subpopulações resistentes (16).

## 2.7 Resistência adaptativa

A resistência adaptativa ou resistência induzida pode ser definida como um fenômeno autorregulado, que se caracteriza pela rápida indução de resistência na presença do fármaco e posterior reversão ao fenótipo sensível na sua ausência. Este fenômeno não é causado pela seleção de cepas mutantes resistentes, mas sim, por alterações fenotípicas para que o microrganismo sobreviva ao efeito letal do fármaco. Diferente da resistência genética, a qual é estável pelo surgimento de mutação cromossômica ou aquisição de elemento genético, a resistência adaptativa demonstra-se instável e reversível (20).

O termo 'resistência adaptativa' surgiu em 1971, quando um estudo verificou que as células vivas são adaptáveis às modificações ambientais, e que este conceito poderia ser estendido aos microrganismos de modo semelhante, a partir do desenvolvimento de resistência pelas bactérias a um agente antimicrobiano, quando expostas a um ambiente na presença deste (108).

No final da década de 1990, estudos de resistência adaptativa à polimixina B, em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, sugeriam que a perda de ácidos graxos hidroxilados dos LPS poderiam perturbar a hidrofobicidade da membrana externa bacteriana, sendo um fator importante no desenvolvimento da resistência induzida a este antimicrobiano (109). Anteriormente, já havia sido demonstrado que importantes elementos da membrana externa bacteriana, como cátions divalentes e fosfolípídeos, estariam drasticamente diminuídos em microrganismos adaptados à polimixina B e que estes elementos retornavam ao normal na ausência do antimicrobiano (110). Assim, componentes que interagem com os LPS poderiam estar diretamente relacionados com a resistência induzida à polimixina B (109).

Embora a resistência a polimixinas na prática clínica não seja comum (20), estudos sobre a resistência adaptativa a este grupo de antimicrobianos foram descritos entre os anos 1970 e 1980 em isolados de bactérias Gram-negativas (111, 112).

Entre importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais, sabe-se que *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo capaz de desenvolver resistência a diversos antibióticos, seja de modo permanente ou temporário (113). Estudos *in vitro*, com exposição a concentrações crescentes de colistina, demonstraram o desenvolvimento de resistência adaptativa neste microrganismo, com redução gradual no efeito do fármaco e diminuição da capacidade bactericida do mesmo. O fenômeno mostrou-se reversível, e o grau de suscetibilidade à colistina retornou aos níveis basais quando da retirada do antimicrobiano. Acredita-se que os sistemas PhoPQ e PmrAB sejam também responsáveis por regular este tipo de resistência, a partir de modificações dos LPS (114). Para *Pseudomonas aeruginosa*, é proposto, ainda, que outros sistemas estejam envolvidos com este tipo de resistência. Um deles seria o ParRS, o qual é necessário pra modificação do operon na presença de concentrações subinibitórias de polimixina B e colistina (21). Também está descrito o sistema regulatório de dois componentes, CprRS, como um dos responsáveis pela resistência adaptativa neste patógeno, podendo ser este sistema mais específico nesta regulação em comparação aos outros (115).

Estudos com polimixina B, em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, com fenótipos de resistência induzida reprodutíveis, a partir da observação dos chamados “skipped wells”, que se caracterizam pelo aparecimento de poços com turbidez extra nos testes de microdiluição em caldo, demonstraram superexpressão de três genes, *phoQ*, *arnB* e PA4773, este último do operon *pmrAB*, apenas nas concentrações dos “skipped wells” (116).

Em isolados de *Acinetobacter baumannii*, também já foi verificada a ocorrência do fenômeno de resistência induzida e reversível a partir da exposição dos isolados a concentrações crescentes de polimixina B (22).

Embora já tenha sido relatada a ocorrência de resistência induzida em importantes patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, para enterobactérias não são encontrados estudos sobre o desenvolvimento de resistência adaptativa às polimixinas.

Para enterobactérias, estão descritos casos de resistência adaptativa para outras classes de antimicrobianos, como aos carbapenêmicos. Resistência induzida

ao imipenem está relatada para *Enterobacter aerogenes*, e a resposta adaptativa foi relacionada com a alteração na expressão de porinas associada à modificação na expressão de bombas de efluxo (117).

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando que a polimixina B torna-se uma das únicas opções terapêuticas em muitas infecções nosocomiais causadas por microrganismos da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos, uma melhor compreensão dos fenômenos de heterorresistência e da resistência adaptativa nesses isolados é de grande importância. Esses fenômenos podem, teoricamente, levar a falhas terapêuticas, e os mesmos não são detectados por técnicas microbiológicas utilizadas na rotina do laboratório. Desta forma, um estudo que avalie a presença desses fenômenos em bactérias envolvidas na etiologia de infecções hospitalares torna-se necessário, para melhor entendimento dos significados clínicos e possíveis implicações terapêuticas.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo principal

Avaliar a ocorrência da heterorresistência e da resistência adaptativa à polimixina B em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC).

### 4.2 Objetivos secundários

1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima à polimixina B de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC;
2. Avaliar a heterorresistência à polimixina B em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC sensíveis à polimixina;
3. Avaliar a resistência adaptativa à polimixina B em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC sensíveis à polimixina;
4. Avaliar a estabilidade das subpopulações heterogêneas;
5. Avaliar a estabilidade do fenótipo de resistência adaptativa à polimixina B;
6. Determinar a relação clonal entre os isolados clínicos originais e suas subpopulações resistentes tanto nos ensaios de heterorresistência como na resistência induzida.

## 5 REFERÊNCIAS

1. O'Hara C M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(1):147-62. Epub 2005/01/18.
2. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;44(1):8-15. Epub 2014/05/06.
3. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *The New England journal of medicine*. 2005;352(4):380-91. Epub 2005/01/28.
4. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, *et al*. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(1):55-60. Epub 2004/06/19.
5. Rice LB, Carias LL, Hutton RA, Rudin SD, Endimiani A, Bonomo RA. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(9):3427-9. Epub 2008/06/25.
6. Murray PR. *Microbiologia Médica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014.
7. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(1):60-7. Epub 2011/06/10.
8. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, *et al*. An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying

*Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(7):1510-3. Epub 2011/05/06.

9. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care. 2006;10(1):R27. Epub 2006/03/02.

10. Gupta S, Govil D, Kakar PN, Prakash O, Arora D, Das S, *et al.* Colistin and polymyxin B: a re-emergence. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine. 2009;13(2):49-53. Epub 2009/11/03.

11. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(9):2070-4. Epub 2011/07/01.

12. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, *et al.* Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. International journal of antimicrobial agents. 2014. Epub 2014/09/30.

13. Mezghani Maalej S, Rekik Meziou M, Mahjoubi F, Hammami A. Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). Medecine et maladies infectieuses. 2012;42(6):256-63. Epub 2012/05/29.

14. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clinical microbiology reviews. 2008;21(3):449-65. Epub 2008/07/16.

15. Poudyal A, Howden BP, Bell JM, Gao W, Owen RJ, Turnidge JD, *et al.* *In vitro* pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2008;62(6):1311-8. Epub 2008/10/17.

16. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(4):946-7. Epub 2011/03/12.
17. Tato M, Morosini M, Garcia L, Alberti S, Coque MT, Canton R. Carbapenem Heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. Journal of clinical microbiology. 2010;48(11):4089-93. Epub 2010/09/17.
18. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, et al. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. Journal of clinical microbiology. 2010;48(7):2601-4. Epub 2010/05/28.
19. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008;14(2):101-4. Epub 2007/12/21.
20. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. International journal of antimicrobial agents. 2011;37(3):187-93. Epub 2011/02/08.
21. Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(8):3372-82. Epub 2010/06/16.
22. Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2013;12:15. Epub 2013/07/04.

23. Velkov T, Deris ZZ, Huang JX, Azad MA, Butler M, Sivanesan S, *et al.* Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate immunity*. 2014;20(4):350-63. Epub 2013/07/28.
24. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(4):933-51, table of contents. Epub 2001/10/05.
25. Gordon NC, Wareham DW. Failure of the MicroScan WalkAway system to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(9):3024-5. Epub 2009/07/31.
26. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(1):333-4. Epub 2008/11/19.
27. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious diseases*. 2009;9(4):228-36. Epub 2009/03/28.
28. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(4):906-9. Epub 2012/01/11.
29. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement* Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
30. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;73(4):354-60. Epub 2012/06/05.

31. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81. Epub 2011/07/29.
32. Evans HL, Lefrak SN, Lyman J, Smith RL, Chong TW, McElearney ST, *et al.* Cost of Gram-negative resistance. *Critical care medicine*. 2007;35(1):89-95. Epub 2006/11/18.
33. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61. Epub 2001/03/21.
34. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, *et al.* A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(8):1664-71. Epub 2010/06/15.
35. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, *et al.* Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(6):2066-9. Epub 2008/04/04.
36. Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(9):3080-3. Epub 2008/07/18.
37. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A

carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1297-300. Epub 2003/03/26.

38. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, *et al*. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of internal medicine*. 2005;165(12):1430-5. Epub 2005/06/29.

39. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, *et al*. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):1354-7. Epub 2009/12/30.

40. Robledo IE, Aquino EE, Vazquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(6):2968-70. Epub 2011/03/30.

41. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1553-5. Epub 2007/01/31.

42. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE, *et al*. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(4):1660-4. Epub 2009/02/04.

43. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36 Suppl 3:S8-14. Epub 2010/12/07.

44. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):440-58, table of contents. Epub 2007/07/17.

45. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60(3):470-82. Epub 2007/06/28.
46. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, *et al.* Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(12):3881-9. Epub 2003/11/26.
47. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003;51(3):711-4. Epub 2003/03/05.
48. Yigit H QA, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(2).
49. Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(12):4793-9. Epub 2004/11/25.
50. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(2):557-62. Epub 2008/11/19.
51. Palepou M.-F.I. WN, Hope R., Colman M., Glover J., Kaufmann M.E., Lafong C., Reynolds R., Livermore D.M. Novel class A carbapenemase, KPC-4, in an *Enterobacter* isolate from Scotland. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; April, 2005.; Copenhagen/Denmark: Abstract number: 1134\_01\_20; 2005.



52. Lamoureaux TL, Frase H, Antunes NT, Vakulenko SB. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class A carbapenemase KPC-6. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):6006-8. Epub 2012/08/22.
53. Lahey Clinic. <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table12015> [cited 2015 February 23].
54. Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, *et al.* Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(2):525-7. Epub 2011/11/26.
55. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, *et al.* Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010;15(46). Epub 2010/12/15.
56. Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, *et al.* Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(8):3990-3. Epub 2013/06/12.
57. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2702. Epub 2009/04/01.
58. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, *et al.* Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3579-83. Epub 2011/05/18.
59. Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in

Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(2):312-6. Epub 2012/10/17.

60. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, *et al.* KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(3):286-8. Epub 2009/05/02.

61. Fass RJ, Barnishan J, Ayers LW. Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1995;36(2):343-53. Epub 1995/08/01.

62. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(6):1206-15. Epub 2007/09/20.

63. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual review of biochemistry*. 1977;46:723-63. Epub 1977/01/01.

64. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet*. 1997;349(9049):418-22. Epub 1997/02/08.

65. Orwa JA, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Isolation and structural characterization of polymyxin B components. *Journal of chromatography A*. 2001;912(2):369-73. Epub 2001/05/02.

66. Kang JW, Van Schepdael A, Orwa JA, Roets E, Hoogmartens J. Analysis of polymyxin B sulfate by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin as additive. Method development and validation. *Journal of chromatography A*. 2000;879(2):211-8. Epub 2000/07/13.

67. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, *et al.* Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious diseases*. 2006;6(9):589-601. Epub 2006/08/26.

68. Hermsen ED, Sullivan CJ, Rotschafer JC. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infectious disease clinics of North America*. 2003;17(3):545-62. Epub 2004/01/09.
69. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(6):1953-8. Epub 2006/05/26.
70. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *The Annals of pharmacotherapy*. 1999;33(9):960-7. Epub 1999/09/24.
71. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2010;13(4-5):132-8. Epub 2010/09/17.
72. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12(4):315-21. Epub 2006/03/10.
73. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(1):183-90. Epub 2001/01/04.
74. Nota Técnica nº 01/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes, (2013).
75. Valentin-Martin A, Valverde-De Francisco A, Bosque-Vall M, Canton-Moreno R. First report of colistin-resistant KPC-2 producing ST258-*Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2013;31(7):489-91. Epub 2013/03/07.

76. Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, *et al.* Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(4):373-6. Epub 2011/08/04.
77. Comandatore F, Sasseria D, Ambretti S, Landini MP, Daffonchio D, Marone P, *et al.* Draft Genome Sequences of Two Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 Isolates Resistant to Colistin. *Genome announcements*. 2013;1(1). Epub 2013/02/14.
78. Kim SY, Choi HJ, Ko KS. Differential expression of two-component systems, *pmrAB* and *phoPQ*, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Current microbiology*. 2014;69(1):37-41. Epub 2014/03/01.
79. Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Crystal structure of *Escherichia coli* ArnA (PmrI) decarboxylase domain. A key enzyme for lipid A modification with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and polymyxin resistance. *Biochemistry*. 2004;43(42):13370-9. Epub 2004/10/20.
80. Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Crystal structure and mechanism of the *Escherichia coli* ArnA (PmrI) transformylase domain. An enzyme for lipid A modification with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and polymyxin resistance. *Biochemistry*. 2005;44(14):5328-38. Epub 2005/04/06.
81. Breazeale SD, Ribeiro AA, McClerren AL, Raetz CR. A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):14154-67. Epub 2005/02/08.
82. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic

antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of bacteriology*. 2004;186(2):575-9. Epub 2004/01/02.

83. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*. 2004;186(13):4124-33. Epub 2004/06/19.

84. Winfield MD, Groisman EA. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17162-7. Epub 2004/12/01.

85. Lacour S, Doublet P, Obadia B, Cozzone AJ, Grangeasse C. A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Research in microbiology*. 2006;157(7):637-41. Epub 2006/07/04.

86. Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PloS one*. 2008;3(8):e3053. Epub 2008/08/30.

87. Perez JC, Groisman EA. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*. 2007;63(1):283-93. Epub 2007/01/19.

88. Delgado MA, Mouslim C, Groisman EA. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Molecular microbiology*. 2006;60(1):39-50. Epub 2006/03/25.

89. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*. 2004;72(12):7107-14. Epub 2004/11/24.

90. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock RE. The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(8):3743-51. Epub 2011/06/08.
91. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of biomedical science*. 2010;17:60. Epub 2010/07/27.
92. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(8):4762-6. Epub 2014/06/11.
93. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, *et al*. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5521-6. Epub 2013/08/28.
94. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, *et al*. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular microbiology*. 1998;27(6):1171-82. Epub 1998/05/07.
95. Breazeale SD, Ribeiro AA, Raetz CR. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(27):24731-9. Epub 2003/04/22.
96. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, *et al*. *In vitro* activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(7):1856-65. Epub 2014/03/22.

97. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Turkoglu S, *et al.* The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014. Epub 2014/09/06.
98. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, *et al.* *MgrB* inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(10):5696-703. Epub 2014/07/16.
99. Hermes DM, Pormann Pitt C, Lutz L, Teixeira AB, Ribeiro VB, Netto B, *et al.* Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 8):1184-9. Epub 2013/05/24.
100. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(1):351-2. Epub 2007/10/24.
101. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(9):2946-50. Epub 2006/08/31.
102. Napier BA, Band V, Burd EM, Weiss DS. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is associated with cross-resistance to the host antimicrobial lysozyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5594-7. Epub 2014/07/02.
103. Deris ZZ, Yu HH, Davis K, Soon RL, Jacob J, Ku CK, *et al.* The combination of colistin and doripenem is synergistic against *Klebsiella pneumoniae* at multiple inocula and suppresses colistin resistance in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(10):5103-12. Epub 2012/07/18.
104. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and

agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3726-30. Epub 2007/07/25.

105. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, Yu HH, *et al.* Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *The Journal of infection*. 2009;58(2):138-44. Epub 2008/12/09.

106. Rodriguez CH, Barberis C, Nastro M, Bombicino K, Granados G, Vay C, *et al.* Impact of heteroresistance to colistin in meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of infection*. 2012;64(1):119-21. Epub 2011/11/03.

107. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(12):4106-11. Epub 2013/10/04.

108. Dean AC. Adaptive drug resistance in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1971;64(5):534-7. Epub 1971/05/01.

109. Conrad RS, Galanos C. Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* adapted to polymyxin B resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1989;33(10):1724-8. Epub 1989/10/01.

110. Conrad RS, Gilleland HE, Jr. Lipid alterations in cell envelopes of polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of bacteriology*. 1981;148(2):487-97. Epub 1981/11/01.

111. Gilleland HE, Jr., Murray RG. Ultrastructural study of polymyxin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 1976;125(1):267-81. Epub 1976/01/01.

112. Gilleland HE, Jr., Champlin FR, Conrad RS. Chemical alterations in cell envelopes of *Pseudomonas aeruginosa* upon exposure to polymyxin: a possible



mechanism to explain adaptive resistance to polymyxin. Canadian journal of microbiology. 1984;30(7):869-73. Epub 1984/07/01.

113. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends in microbiology. 2011;19(8):419-26. Epub 2011/06/15.

114. Mohamed AF, Cars O, Friberg LE. A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(5):1350-61. Epub 2014/01/30.

115. Fernandez L, Jenssen H, Bains M, Wiegand I, Gooderham WJ, Hancock RE. The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(12):6212-22. Epub 2012/09/26.

116. Boyle B, Fernandez L, Laroche J, Kukavica-Ibrulj I, Mendes CM, Hancock RW, *et al.* Complete genome sequences of three *Pseudomonas aeruginosa* isolates with phenotypes of polymyxin B adaptation and inducible resistance. Journal of bacteriology. 2012;194(2):529-30. Epub 2011/12/31.

117. Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Pages JM, Davin-Regli A. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. International journal of antimicrobial agents. 2013;41(2):130-6. Epub 2013/01/03.

**6 ARTIGO EM INGLÊS (A ser submetido ao *Journal of Medical Microbiology*)**

**Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in KPC-producing *Enterobacteriaceae* isolates**

Daniela I. Luz<sup>1</sup>, Laura C. Antochervis<sup>2</sup>, Cibele M. Magagnin<sup>1</sup>, Fabiane J. Vieira<sup>2</sup>, Afonso L. Barth<sup>1,3</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; <sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, UFRGS , Brazil; <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Brazil; <sup>4</sup> Infectious Disease Service, HCPA, Brazil,

Corresponding author:

Alexandre Prehn Zavascki

[apzavascki@gmail.com](mailto:apzavascki@gmail.com)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 90035-903

## Abstract

**Background:** *Enterobacteriaceae* representants are important agents of nosocomial infections and have high capacity to acquire mechanisms of resistance. Resistance rates to polymyxin B in surveillance studies have been low despite its increasing use worldwide as the last resort therapy for multidrug resistant Gram-negative bacilli. However, two other resistance phenotypes, hetero- and adaptive resistance, have been reported to polymyxin. “We aimed to investigate the presence of polymyxin B hetero- and adaptive resistance and evaluate the stability of these phenomenon in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (KPE) isolates.

**Methods:** EKP isolates were recovered from hospitalized patients at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Heteroresistance was determined by population analysis profile (PAP). Adaptive resistance was evaluated after serial daily passages of isolates in Mueller-Hinton Agar containing increasing polymyxin B concentrations. MICs of polymyxin B of colonies growing at the highest polymyxin B concentration were further determined after daily subcultured in antibiotic-free medium and after storage at -80°C. By PFGE, we evaluated the clonal relationship between the initial clinical isolates and resistant subpopulations.

**Results:** Were evaluated four isolates of *Klebsiella pneumoniae* characterized as four different clones (K1, K2, K3 and K4), as well as the three isolates of *Enterobacter cloacae* - two identical clone (EC1A and Ec1b), but with different and distinct phenotypic profiles (Ec2) and a strain of *Escherichia coli* (E1). The initial MICs for polymyxin B, performed by broth microdilution, were between 0.0625 and 0.25 µg/mL. Four strains were heteroresistant (K1, K2, K3 and K4) which growth in concentrations 2 (K2), 3 (K1, K4) and 6 µg/ml (K3), and their MIC after four days passage through free antibiotic medium remained high (K1 4 µg/mL, K2 and K3 16 µg/mL and K4 2 µg/mL). The heteroresistant subpopulations represent 0.000087% to 0.00036% of their original populations. Three samples showed adaptive resistance (K1, K3 and K4), which growth in polymyxin B concentration of 64 µg/mL and MIC after four days passage in antibiotic-free medium was 32 µg/ml for all three isolates.

MICs remained elevated after two and six months storage, both isolates heteroresistant as those inducing resistance.

**Conclusions:** The presence of subpopulations with higher polymyxin B MIC was extremely common and high level adaptive resistance was very frequent in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

### Keywords

*Enterobacteriaceae*, polymyxin B, heteroresistance, adaptive resistance, carbapenemase.

### Background

The increasing worldwide prevalence of *Enterobacteriaceae* multi-drug resistant is of great concern, since treatment becomes restricted to very few options (1, 2) and there is high mortality among patients with bloodstream infections caused by carbapenemase-producing bacteria (3). In the 90s, polymyxins B and E (colistin) back into use as therapeutic option against infections caused by multi-drug resistant Gram-negative (4, 5), and resistance rates for those antibiotics in surveillance studies fortunately remain very low (6). However, two relatively poorly understood resistance phenotypes, hetero- and adaptive resistance, have been reported in these drugs (7-9).

Heteroresistance is characterized by the growth of resistant subpopulations among a susceptible population to a particular (10). The adaptive resistance is a self-regulating phenomenon that is characterized by rapid induction of resistance in the presence of the antimicrobial and the subsequent reversal in the absence sensitive (9).

In polymyxin B, these phenomena are not well known for *Enterobacteriaceae*. The objective of this study was to evaluate the occurrence of heteroresistance and adaptive resistance in isolates of *Enterobacteriaceae* producing KPC.

## Methods

### Bacterial Strains

Eight *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase-producing (EKP) isolates were recovered from patients colonized and/or infected at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Isolates were screened for *bla*<sub>KPC</sub> by High Resolution Melt analysis. Those isolates were previously typed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and MICs for carbapenems (ertapenem, imipenem and meropenem) showed they were resistant to those antibiotics (11).

MICs for polymyxin B were determined by broth microdilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (12). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were included as quality control in all tests. Susceptibility to polymyxin B was considered when an isolate presented a MIC 2 mg/L.

### Heteroresistance

Heteroresistance in selected EKP isolates was determined by population analysis profile (PAP) that is the observation of resistant subpopulations when inoculated different dilutions of the isolates on agar medium plates containing antibiotic concentrations over the original MICs.

Isolates were tested in duplicate using 20 µL aliquots from serial dilutions in saline using a 0.5 McFarland standard inoculum (approximately 10<sup>8</sup> bacterial colony-forming units - CFU) on Mueller-Hinton (MH) agar plates containing 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 16 mg/L of polymyxin B. Colonies were counted after 48h of incubation at

35°C. The limit of counting was 20 CFU/mL. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used for quality control.

Isolates containing subpopulations that grew at polymyxin B  $\geq 2$  mg/L were considered heteroresistant. The frequency of heteroresistant subpopulations was calculated by dividing the number of CFU on the plate with the highest concentration of polymyxin B by the number of CFU on the control plate (with no antibiotic).

Polymyxin B MICs of the colonies that grew at the highest concentrations of polymyxin B were determinate after daily sub-cultured in antibiotic-free MH for four days and after two and six months storage at -80°C.

### **Adaptive Resistance**

Isolates were submitted to serial daily passages on Mueller-Hinton Agar plates containing increasing polymyxin B concentrations. Three experiments were made: a) concentrations of 0.25 to 64 mg/L for a total of nine days; b) concentrations of 0.125 to 64 mg/L for a total of ten days and c) concentrations of 0.03 to 64 mg/L for a total of twelve days. Isolates were tested using 10  $\mu$ L aliquots from a 0.5 McFarland standard inoculum. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used for quality control.

MICs of polymyxin B of colonies growing at the highest polymyxin B concentration (>2 mg/L) were also determined after daily subculture in antibiotic-free MH for four days and after two and six months storage -80°C.

### **Results**

Of the eight EKP evaluated, there were four isolates of *K. pneumoniae* characterized as four distinct strains (K1, K2, K3, K4); three isolates of *E. cloacae* divided in two molecularly indistinguishable strains (Ec2a and Ec2b), but with different phenotypic profiles, and one different strain (Ec1); and one strain of *Escherichia coli* (C1). MICs of polymyxin B ranged from 0.0625 and 0.25 mg/L and *bla*<sub>KPC-2</sub> was detected in the

eight EKP. All the isolates were submitted to heteroresistant and adaptive resistance experiments.

Four isolates of *K. pneumoniae* (K1, K2, K3 and K4) presented heteroresistance, which grew at polymyxin B concentrations  $\geq 2$  mg/L. The frequency of heteroresistant subpopulations ranged from 0.000087% to 0.00036%. Polymyxin B MICs of the four subpopulations remained higher than the original population MIC after daily passages on antibiotic free-medium and after two and six months storage at  $-80^{\circ}$ , showing stability of the phenomena. Isolates of *E. cloacae* and *E. coli* did not show heteroresistance. (Table 1).

In adaptive resistance experiments, it was observed that according to the experiments started with lower subinhibitory concentrations, more isolates showed adaptive resistance. In first experiment, one isolate of *K. pneumoniae* (K1) growth in plates containing 64 mg/L of polymyxin B. In second experiment, two isolates of *K. pneumoniae* (K1 and K3) growth in 64 mg/L polymyxin B plates. In third experiment, in three isolates of *K. pneumoniae* (K1, K3 and K4), growth was observed in plates containing 64 mg/L of polymyxin B (Table 2). After four days passages on antibiotic free-medium, the MICs decreased one dilution for the three isolates. Polymyxin B MICs were performed after two months storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and remained the same for two isolates and decreased one dilution for one of them. After six months storage, MICs decreased one dilution for three isolates with adaptive resistance. Despite reducing values of MICs, the isolates remained resistant to polymyxin B (Table 2).

There was a clonal relation between the original populations and their respective resistant subpopulations in all strains.

## Discussion

Heteroresistance is characterized by the development of an antimicrobial-resistant subpopulation within an otherwise susceptible bacterial population. Our study showed the presence of heteroresistant subpopulations for all *K. pneumoniae* isolates evaluated, and the stability of the phenomena was observed in the polymyxin

B MICs after two and six months storage. Other studies showed instability of heteroresistant isolates after daily passages to free-antibiotic medium (10, 13).

For *Enterobacteriaceae*, there are reports of heteroresistance to polymyxin B only for *Enterobacter* spp. (14). Heteroresistance to polymyxin B has been described for *Pseudomonas aeruginosa* (7). For other important pathogens, including *Acinetobacter baumannii* and *K. pneumoniae*, studies report cases of heteroresistance to colistin (8, 15, 16).

In *K. pneumoniae*, studies with colistin, showed a frequency of resistant subpopulations ranging from  $3.5 \times 10^{-5}$  to  $4.4 \times 10^{-7}$  in isolates from patients previously exposed to colistin, and from  $1.5 \times 10^{-5}$  to  $3.2 \times 10^{-7}$  for isolates without prior exposure (17).

Our study showed frequency of resistant subpopulations to polymyxin B, with proportions ranging from  $3.6 \times 10^{-6}$  to  $8.7 \times 10^{-7}$ . Furthermore, it was the first report of heteroresistance to polymyxin B in *K. pneumoniae* isolates. We did not evaluate molecular determinants of these phenotypes in this study, although we demonstrated the stability of them. The clinical significance of hetero-resistance remains unclear (8). Further studies are necessary to determine the potential of resistant subpopulations in therapeutic failures.

The adaptive resistance to polymyxin B was observed in three of four *K.pneumoniae* isolates and the MICs of these subpopulations remained high after four days in antibiotic-free medium and after two and six months of storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . However, other studies report that adaptive resistance it is a transient phenomenon, and the MICs of resistant subpopulations return to their original values after the passages in antibiotic-free medium (9). Thus, the stability of the MICs in our adaptive resistance experiments, suggests that these populations with induced might be, in fact, heteroresistant subpopulations.

There are not recent studies that evaluate the mechanisms of adaptive resistance to polymyxins in *Enterobacteriaceae*. Studies on isolates of *P.aeruginosa* with adaptive resistance to colistin suggest that the same regulatory mechanisms of resistance to polymyxin, and PhoPQ PmrAB, are involved in the regulation of induced resistance,



although other regulatory systems are also associated with this phenomenon, as ParRS and CprRS (18-20).

In summary, our study showed that the presence of heteroresistance in *K.pneumoniae* isolates was extremely common, while it was not observed in isolates from *E. cloacae* and in the isolate of *E. coli*. Additionally, high level adaptive resistance was also very frequent for this specie. The clinical significance of each phenomenon should be further investigated, since both may potentially affect the outcomes of patients on therapy with polymyxins.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (13-0075) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (11/0898-3), Brazil. A. P. Z. and A. L. B. are research fellows from the National Council for Scientific and Technological Development, Ministry of Science and Technology, Brazil.

### **References**

1. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;73(4):354-60. Epub 2012/06/05.
2. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81. Epub 2011/07/29.

3. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(9):785-96. Epub 2013/08/24.
4. Gupta S, Govil D, Kakar PN, Prakash O, Arora D, Das S, *et al.* Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2009;13(2):49-53. Epub 2009/11/03.
5. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(6):1206-15. Epub 2007/09/20.
6. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(9):2070-4. Epub 2011/07/01.
7. Hermes DM, Pormann Pitt C, Lutz L, Teixeira AB, Ribeiro VB, Netto B, *et al.* Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 8):1184-9. Epub 2013/05/24.
8. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(4):946-7. Epub 2011/03/12.
9. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;37(3):187-93. Epub 2011/02/08.
10. Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2013;12:15. Epub 2013/07/04.

11. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, *et al.* Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 11):1721-7. Epub 2013/09/04.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
13. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, *et al.* Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(7):2601-4. Epub 2010/05/28.
14. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(12):4106-11. Epub 2013/10/04.
15. Mezghani Maalej S, Rekik Meziou M, Mahjoubi F, Hammami A. Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax (Tunisia). *Medecine et maladies infectieuses*. 2012;42(6):256-63. Epub 2012/05/29.
16. Rodriguez CH, Barberis C, Nastro M, Bombicino K, Granados G, Vay C, *et al.* Impact of heteroresistance to colistin in meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of infection*. 2012;64(1):119-21. Epub 2011/11/03.
17. Poudyal A, Howden BP, Bell JM, Gao W, Owen RJ, Turnidge JD, *et al.* In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(6):1311-8. Epub 2008/10/17.
18. Mohamed AF, Cars O, Friberg LE. A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(5):1350-61. Epub 2014/01/30.
19. Fernandez L, Jenssen H, Bains M, Wiegand I, Gooderham WJ, Hancock RE. The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive

resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(12):6212-22. Epub 2012/09/26.

20. Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(8):3372-82. Epub 2010/06/16.

**Table 1.** Results of population analysis profile (PAP) of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* isolates to polymyxin B

n	Isolates	Strain	Original PMB MIC (mg/L)	Highest concentration where growth occurred in PAP (mg/L)	Frequency (%) of hetero-resistant subpopulations	MIC PMB after 4 days daily passages in drug -free medium (mg/L)	MIC PMB after 2 months storage (mg/L)	MIC PMB after 6 months storage (mg/L)
1	<i>E. cloacae</i>	E1	0.125	1	NA	≤ 0.125	NP	NP
2	<i>E. cloacae</i>	E2a	0.125	1	NA	≤ 0.125	NP	NP
3	<i>E. cloacae</i>	E2b	0.125	1	NA	≤ 0.125	NP	NP
4	<i>K. pneumoniae</i>	K1	0.125	3	0.000087	<b>4</b>	4	2
5	<i>K. pneumoniae</i>	K2	0.0625	2	0.00025	<b>16</b>	16	16
6	<i>K. pneumoniae</i>	K3	0.125	8	0.000154	<b>16</b>	16	16
7	<i>K. pneumoniae</i>	K4	0.25	3	0.00036	<b>2</b>	2	2
8	<i>E. coli</i>	C1	≤ 0.03	0,5	NA	≤ 0.125	NP	NP

PMB, polymyxin B; NA, not applicable; NP, not performed

**Table 2.** Results of adaptive resistant to polymyxin B experiments of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* isolates

n	Isolates	Strain	Original PMB MIC (mg/L)	Highest concentration where growth was observed (mg/L)	MIC PMB after 4 days daily passages in drug-free medium (mg/L)	MIC PMB after 2 months storage (mg/L)	MIC PMB after 6 months storage (mg/L)
1	<i>E. cloacae</i>	E1	0.125	0,5	NA	NP	NP
2	<i>E. cloacae</i>	E2a	0.125	0,5	NA	NP	NP
3	<i>E. cloacae</i>	E2b	0.125	0,5	NA	NP	NP
4	<i>K. pneumoniae</i>	K1	0.125	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
5	<i>K. pneumoniae</i>	K2	0.0625	1	NA	NP	NP
6	<i>K. pneumoniae</i>	K3	0.125	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
7	<i>K. pneumoniae</i>	K4	0.25	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>8</b>
8	<i>E. coli</i>	C1	≤ 0.03	0,5	NA	NP	NP

PMB, polymyxin B; NA, not applicable; NP, not performed

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi verificada a existência de subpopulações heterorresistentes frente à polimixina B para os quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* estudados. Não foi detectada a ocorrência de heterorresistência nos isolados de *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli*.

O estudo demonstrou estabilidade do fenômeno de heterorresistência nos isolados de *K. pneumoniae*, pois as CIMs das subpopulações mantiveram-se elevadas após quatro dias em meio livre de antibiótico e após dois e seis meses de armazenamento a -80°C.

A resistência adaptativa à polimixina B foi observada em três dos quatro isolados de *K. pneumoniae*, e as CIMs destas subpopulações mantiveram-se elevadas após quatro dias em meio livre de antibiótico e após dois e seis meses de armazenamento a -80°C. Entretanto, outros estudos relatam que a resistência adaptativa trata-se de um fenômeno transitório, e as CIMs das subpopulações resistentes retornam aos seus valores originais após as passagens em meio livre de antibiótico. Assim, pela estabilidade das CIMs no estudo de resistência adaptativa, pode-se sugerir que estas subpopulações resistentes tratam-se, na verdade, de subpopulações heterorresistentes.

A relação clonal entre os isolados clínicos originais e suas respectivas subpopulações resistentes foi verificada por PFGE.

Com os resultados deste estudo, sugere-se que fenômenos moleculares podem estar envolvidos com os fenômenos de heterorresistência e resistência adaptativa. Estudos moleculares futuros devem ser realizados para melhor compreensão dos fenótipos observados.