

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Laura Czekster Antochervis

Avaliação da presença de heterorresistência à polimixina B em
Klebsiella pneumoniae produtora de *Klebsiella pneumoniae*
carbapenemase (KPC) isolada em hemoculturas de paciente
em tratamento com este antibiótico

Porto Alegre, novembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Laura Czekster Antochervis

Avaliação da presença de heterorresistência à polimixina B em
Klebsiella pneumoniae produtora de *Klebsiella pneumoniae*
carbapenemase (KPC) isolada em hemoculturas de paciente
em tratamento com este antibiótico

Trabalho de Conclusão
apresentado à Comissão de
Graduação do Curso de
Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito para
obtenção do título em
Farmácia.

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki
Orientador

Porto Alegre, novembro de 2014

A sutileza humana nunca irá conceber uma
invenção mais bonita, mais simples, ou
mais direta do que a natureza, porque em
suas invenções, nada falta – e
nada é supérfluo.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki, por ter acreditado em mim mesmo quando eu não me sentia capaz. Muito obrigada pelo tempo e dedicação nas orientações, pelo contínuo aprendizado, pela eterna paciência, pela amizade e pela oportunidade de trabalharmos juntos, me motivando a seguir nesta área de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth, pelos tantos conselhos e tempo dedicado para sanar minhas dúvidas. Agradeço a atenção, o apoio e também as histórias contadas sobre sua carreira, as quais me inspiram.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por todo apoio, colaboração, disponibilidade e compreensão. Só tenho a agradecer pelo convívio com vocês e pela amizade que cultivamos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizar as amostras e o espaço para realização de todos os ensaios, e em memória da paciente que tornou possível a elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, Renê e Heloíza, à minha irmã Helena e ao meu namorado Gregory pelo amor e apoio incondicional, sem os quais eu não teria conseguido chegar até este dia. Muito obrigada pelas palavras de carinho e incentivo, por sempre me dizerem “vai passar” e pelos abraços quando eu mais precisava. Dedico este trabalho aos meus familiares e em memória de minha avó Elsa, que compartilhou deste sonho e sempre me incentivou a trabalhar na área da saúde, para que um dia pudesse cuidar dela.

SUMÁRIO

RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Enterobactérias.....	10
2.2. Polimixinas.....	12
2.2.1. Mecanismo de ação das polimixinas.....	13
2.2.2. Mecanismos de resistência às polimixinas.....	13
2.3. Heterorresistência.....	15
3. OBJETIVO	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. Caso clínico e amostras.....	18
4.2. Identificação.....	19
4.3. Caracterização molecular.....	19
4.4. Teste de suscetibilidade.....	20
4.5. <i>Etest</i> ®.....	20
4.6. Ensaio de heteroresistência.....	21
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28

8. REFERÊNCIAS.....29

RESUMO

Klebsiella spp. pertencente à família *Enterobacteriaceae* é um importante patógeno responsável por causar graves infecções comunitárias e nosocomiais. Atualmente, as taxas de resistência aos carbapenêmicos identificadas em isolados dessa espécie vem aumentando, gerando grande preocupação quanto ao manejo no tratamento, já que são poucas as opções eficazes de antibióticos no mercado. Desse modo, medicamentos antigos como as polimixinas retornaram à prática clínica, mas relatos de fenômenos de heterorresistência a esta classe de antibióticos já são descritos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do fenômeno de heterorresistência em amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de paciente hospitalizada em tratamento com polimixina B. A pesquisa da heterorresistência foi realizada através da análise do perfil populacional (PAP), que trata-se da observação de subpopulações resistentes quando inoculadas diferentes diluições do isolado em meio de cultura sólido contendo antibióticos em concentrações maiores que aquela correspondente à concentração inibitória mínima (CIM). Também foi realizada técnica de tipagem molecular (PFGE), entre as populações originais e respectivas subpopulações resistentes e ensaios de microdiluição em caldo para determinação das CIMs. Foram avaliados 7 isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Kp_{1.1}, Kp_{2.1}, Kp_{2.2}, Kp_{2.3}, Kp_{3.1}, Kp_{3.2} e Kp_{3.3}), coletados de paciente hospitalizada que apresentava infecção em corrente sanguínea, em 3 diferentes dias. As suas CIMs para polimixina B, realizadas por microdiluição em caldo, foram entre 0,125 e 16µg/mL, demonstrando valor mais elevado gradativamente, até atingir completa resistência no último grupo de amostras coletadas. Todas as amostras com perfil sensível a polimixina B foram analisadas através do PAP e demonstraram heterorresistência, das quais três cresceram em concentrações acima do *breakpoint* para polimixinas (Kp_{1.1H} em 6 µg/mL, Kp_{2.1H} em 16 µg/mL, Kp_{2.2H} em 8 µg/mL e Kp_{2.3H} em 64 µg/mL) e uma cresceu em 1 µg/mL (Kp_{1.1H'}). Suas CIMs após passagem em meio livre de antibiótico se mantiveram altas em sua grande maioria – entre 1 µg/mL, e 64µg/mL. Através de análise do PFGE verificou-se a presença de dois perfis clonais. A partir de série bioquímica e sequenciamento do gene 16S pode-se observar que na primeira amostra encontravam-se duas espécies, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae*, porém, após exposição ao tratamento com polimixina B, a segunda espécie se manteve nas amostras subsequentes e a *K. oxytoca* desapareceu. As subpopulações heterorresistentes representaram 0,00001% a 0,0045% de suas populações originais.

Palavras-chave: heterorresistência. polimixinas. carbapenemases. bacteremia, *Klebsiella pneumoniae*. carbapenemase.

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella spp. é um importante patógeno da família das enterobactérias, responsável por causar graves infecções comunitárias e nosocomiais.^{1,24} A partir dos anos 80 surgem microorganismos produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), resistência essa primeiramente descrita em isolado de *K. pneumoniae* e que poderia ser associada a falha terapêutica pela ineficácia frente a diversos antibióticos β -lactamâmicos e de outras classes, como quinolonas.^{1,28} Os carbapenêmicos foram os antimicrobianos de escolha para o tratamento de tais infecções, mas seu uso intensivo levou à emergência de outro mecanismo de resistência no início de 1990: as carbapenemases, que conferem resistência a todos agentes β -lactamâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.^{1,2, 24,26} O gene codificador da KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), a carbapenemase mais frequentemente envolvida com resistência aos carbapenêmicos, usualmente encontra-se em sequências de transposons ou plasmídeos, proporcionando alto potencial de disseminação dessa resistência, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial devido aos poucos tratamentos disponíveis.^{1,2}

As polimixinas então ressurgem como agentes de última opção no tratamento de patógenos Gram-negativos multirresistentes.^{8,6} As polimixinas são antibióticos polipeptídeos que apresentam atividade bactericida concentração-dependente e compõe um restrito grupo de agentes usados no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases.^{8,6} Dentro da classe, polimixina B e colistina são as únicas disponíveis para uso clínico.³⁸ Porém, já existe um número crescente de estudos reportando resistência completa às polimixinas entre cepas de *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.^{13,31} O mecanismo mais significativo envolve modificações da membrana externa bacteriana, como a alteração da composição do lipopolissacarídeo (LPS) e, menos comumente, aumento da produção da cápsula celular presente em *Klebsiella pneumoniae*.¹⁰

A heteroresistência, fenômeno onde subpopulações resistentes emergem dentro de uma população suscetível, costuma estar associada à exposição a uma dosagem subótima de polimixina, porém sua relevância clínica ainda permanece indeterminada.^{10,24} Este fenômeno não consegue ser detectado por métodos de microdiluição em caldo, mas sua presença pode ser indicada pela presença de colônias ao longo da zona de inibição em fitas *Etest*® ou por

disco difusão¹⁷ Muitos estudos relatam a ocorrência de heterorresistência à colistina em isolados de *Acinetobacter* spp. sensíveis à essa polimixina, sendo raros os relatos da presença do fenômeno em isolados de enterobactérias tratados com polimixina B.¹⁶ O presente trabalho baseou-se no caso de uma paciente internada na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por infecção de corrente sanguínea, da qual foram colhidas grupos de amostras de sangue em três dias diferentes, compostos por três frascos aeróbicos de hemocultura. Os resultados de todas as amostras colhidas revelaram o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. O tratamento com a polimixina B foi iniciado após a primeira coleta de hemocultura (1º dia), a qual havia sido caracterizada como sensível à polimixina B, porém, as coletas subsequentes revelaram o crescimento dessa bactéria em vigência do tratamento. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) à polimixina B das últimas amostras foram variáveis, demonstrando valor mais elevado gradativamente. A partir destes dados, a presença do fenômeno da heterorresistência nas amostras foi avaliada, a fim de verificar se subpopulações heterorresistentes dos isolados pudessem emergir a partir da pressão seletiva iniciada pelo antibiótico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enterobactérias

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos fermentadores, constituintes da microbiota intestinal e patógenos oportunistas, sendo uma importante fonte de infecções comunitárias e hospitalares. Esses microorganismos podem se disseminar facilmente entre os seres humanos através da aquisição por transferência horizontal de genes de resistência, geralmente mediado por transposons e plasmídeos.²⁷ Espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., representam importantes patógenos em pacientes hospitalizados, aparecendo como os principais responsáveis por infecções sanguíneas dentro da classe de Gram-negativos e ocupando o segundo lugar nas ocorrências em pacientes com pneumonia.¹⁸ *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são causadores de quase 40% das bacteremias comunitárias e também são responsáveis por 60%-75% das bacteremias associadas a Gram-negativos.³⁶

As principais classes de antibióticos utilizadas para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos são cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas. A partir da década de 80, porém, surgiram os primeiros relatos de resistência desses microrganismos aos antibióticos β -lactâmicos, devido a emergência de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), as quais se disseminaram rapidamente entre as enterobactérias, especialmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.^{8,5} ESBLs são compostas por um complexo grupo de enzimas capazes de hidrolisar uma grande variedade de antibióticos das classes dos β -lactâmicos – com exceção dos carbapenêmicos- e, quando associadas a outros fatores de resistência no mesmo plasmídeo, apresentam um grande desafio terapêutico.⁸ Os genes que codificam para essas enzimas geralmente estão localizados em plasmídeos, os quais são frequentemente transferidos entre gêneros da família *Enterobacteriaceae*. A partir desse novo perfil de resistência, as drogas antimicrobianas da classe dos carbapenêmicos foram estabelecidas como último recurso terapêutico. Porém, com o uso intensivo dessa terapia, associada ao surgimento de novos mecanismos de resistência, emergiram as enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERCs). Inicialmente, a resistência a carbapenêmicos nesses microorganismos foi atribuída à produção de ESBL e Amp C associada a modificações da

membrana externa bacteriana e/ou aumento da produção de bombas de efluxo. Posteriormente, a produção de carbapenemases - enzimas capaz de hidrolisar antibióticos da classe dos carbapenêmicos- foram sendo descritas com frequência crescente e, hoje, fazem das ERCs um problema de saúde pública mundial.^{14,24,27,32}

As carbapenemases identificadas em espécies de *Enterobacteriaceae* podem ser subdivididas em 3 classes: A, B e D. Carbapenemases de classe B incluem *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase* (VIM), *imipenem-hidrolizing β -lactamase* (IMP) e *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM), as quais possuem zinco em seus sítios ativos e são inibidas na presença de ácido etilendiamino tetracético (EDTA). A classe D é representada pela *oxacilin-hidrolizing metallo- β -lactamase* (OXA), que contem serina em seu sítio ativo e não é inibida por EDTA ou ácido clavulânico. A OXA-48 β -lactamase é a representante mais comum dessa classe, tendo sido inicialmente identificada principalmente em amostras de *K. pneumoniae* provenientes da Turquia, Líbano e Bélgica. Hoje, é importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em vários países europeus. As carbapenemases da classe A consistem da *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Guiana extended-spectrum β -lactamase* (GES), as quais também possuem serinas em seus sítios ativos e são parcialmente inibidas por ácido clavulânico. As KPCs são enzimas plasmidiais emergentes identificadas inicialmente em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae*. A primeira ocorrência de KPC em um isolado de *K. pneumoniae* de 1996 foi relatada em 2001; atualmente já existem relatos de diversas variantes KPC em diversos gêneros de enterobactérias, predominando, porém, a KPC-2 e a KPC-3.^{1,18,26} Isolados carreadores de KPC, frequentemente demonstram resistência a múltiplas classes de antibióticos além dos carbapenêmicos, como penicilinas e cefalosporinas, limitando ainda mais as opções terapêuticas.^{2,6} Polimixinas são os antimicrobianos mais usados para o tratamento de infecções causadas por espécies da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos.¹⁹

Devido a emergência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e as limitadas opções de tratamento disponíveis faz-se urgente um maior controle da prevalência dessas ocorrências, a fim de evitar a disseminação de isolados resistentes a esta classe de antibióticos.⁸

2.2. Polimixinas

Polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos sintetizadas pelo *Bacillus polymyxa*, sendo a classe de antimicrobianos mais usada no tratamento de bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos (BGN – RC).^{38,39} Nesta classe incluem-se a polimixina B e a colistina (polimixina E), as quais estão disponíveis para uso clínico.^{10,38} Foram descobertas na década de 1940 (polimixina B foi desenvolvida em 1947) e vastamente usadas até meados dos anos 1980, quando tiveram seu uso abandonado devido aos efeitos adversos e nefrotoxicidade reportados.^{10, 34} No final da década de 90, devido a escassa disponibilidade de alternativas e em função do estagnamento no desenvolvimento de novas moléculas antibióticas¹, as polimixinas reapareceram como opção terapêutica para o tratamento de BGN-RC após a emergência de patógenos multirresistentes.¹⁰ Apesar da reutilização desta classe de antibiótico ser recente, já existe um número crescente de estudos reportando resistências a polimixina em cepas de *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae*.¹³

Estruturalmente, as polimixinas consistem de um anel cíclico de aminoácidos com uma cadeia tripeptídica, a qual se liga à parte lipídica da molécula. O anel de peptídeo catiônico desses antibióticos é o mesmo entre as duas polimixinas, com exceção de um único aminoácido: fenilalanina na polimixina B e leucina na colistina.¹⁰ Contudo, a farmacocinética da polimixina B e colistina diferem notavelmente devido as diferentes formas farmacêuticas em que são administradas - forma ativa e pró-fármaco, respectivamente.³⁸ Basicamente, seus mecanismos de ação se dão através do rompimento das membranas externa e citoplasmática bacterianas, causando perda do conteúdo interior da célula.¹³

A polimixina B é constituída por pelo menos quatro componentes - polimixina B1 a B4, os quais diferem apenas na porção que contem ácidos graxos, estando as polimixinas B1 e B2 em maior proporção.³⁹

A polimixina B não possui atividade contra bactérias Gram-positivas ou anaeróbias e espécies como *Providencia* spp., *Neisseria* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens* e *Burkholderia cepacia* apresentam resistência intrínseca às polimixinas.^{10,39} Porém, a polimixina B é ativa frente a uma variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo as espécies mais relevantes da família *Enterobacteriaceae* e espécies não fermentadoras. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* costumam ser sensíveis à polimixina B, porém uma tendência ao aumento dos casos de resistência à polimixina B pode ser observada em

amostras de *Klebsiella* spp. provenientes das regiões do Pacífico e Ásia e também da América Latina.^{13,39} Entre os isolados de *K. pneumoniae* da coleção do SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program) não suscetíveis a imipenem, 12% mostraram resistência a colistina.³⁶ A resistência à polimixina B vem sendo observada em isolados clínicos de *K.pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, porém, relatos do desenvolvimento dessa resistência *in vivo* durante o tratamento com polimixina B são raros.¹⁹

2.2.1 Mecanismo de ação das polimixinas

As polimixinas são agentes bactericidas rápidos que interagem com o lipopolissacarídeo (LPS) do exterior da membrana das bactérias Gram-negativas. O LPS é um componente estrutural da membrana externa bacteriana, carregado negativamente e que consiste em antígeno O, núcleo de polissacarídeo e lipídio A. O anel da polimixina que possui carga positiva liga-se ao lipídio A da membrana exterior, deslocando os íons cálcio e magnésio que estabilizam o LPS. Já as cadeiras laterais de ácidos graxos também interagem com os LPS, contribuindo para a inserção da polimixina na membrana externa. As polimixinas produzem um efeito físico destrutivo, levando a uma mudança na permeabilidade da membrana externa, perda dos componentes celulares e consequente morte da bactéria^{1,39}.

2.2.2 Mecanismos de resistência às polimixinas

Bactérias Gram-negativas podem vir a desenvolver resistência à polimixina B e colistina através de mecanismos moleculares regulados por um sistema de dois componentes comuns as duas e já caracterizados em diversas espécies bacterianas, principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*. Um dos mecanismos de maior ocorrência envolve a modificação da membrana externa da bactéria, geralmente por alteração de porção do LPS, o que reduz ou inibe a interação com o antibiótico. Essas modificações podem ocorrer com a adição da 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (Lara4N) a um grupo fosfato do lipídio A, que modifica sua carga, diminuindo assim sua afinidade às polimixinas carregadas positivamente. A biossíntese da Lara4N é mediada por dois componentes regulatórios distintos, PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB, os quais funcionam como sensores que respondem a baixas concentrações de magnésio e altas

de cálcio, alterações no pH e proteínas citoplasmáticas. Em *P. aeruginosa* esse sistema também induz a transcrição de uma porina OprH.^{7,10, 31,33,39}

Outros mecanismos envolvem o desenvolvimento de bombas de efluxo, como os encontrados em cepa de *Yersina* spp.³⁹ Em *K. pneumoniae*, a presença da cápsula é essencial para o surgimento de resistência a polimixina B, devido a um aumento na produção de um polissacarídeo capsular.^{10,39} Kwa *et al* descreveram a identificação e caracterização de um novo sistema regulatório em amostra de *P. aeruginosa*, que aumenta a resistência a diversos antibióticos, incluindo as polimixinas, através de ativação de operon¹²

Em 2009, Lee *et al* descreveram o decréscimo de suscetibilidade à polimixina B durante o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos. O estudo propõe que o mecanismo de resistência dessas cepas possa ser mediado por modificação no LPS ou pelo aumento do polissacarídeo capsular e que uma re-infecção com uma cepa onde a resistência tenha emergido após pressão seletiva na presença do tratamento com polimixina B também podem estar relacionado.¹⁹

Alguns estudos recentes tem demonstrado uma correlação muito fraca entre os diferentes testes de suscetibilidade para polimixinas, possivelmente devido à difusão dificultada do peptídeo em ágar pela sua propriedade catiônica, mas também pela presença de heterorresistência. Qualquer resistência obtida por métodos de disco-difusão devem ser confirmados por microdiluição em caldo. Além disso, a atividade *in vitro* da polimixina pode ser afetada pela concentração de cátions no meio de cultura.^{18,39} Ensaio por *Etest*®, quando comparados aos métodos de diluição, apresentaram taxas de erro significantes em isolados de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K.pneumoniae*.¹⁸

2.3. Heterorresistência

O termo heterorresistência refere-se à emergência de resistência a determinado antibiótico por uma subpopulação presente em uma população sensível a este antibiótico, segundo os pontos de corte de testes de suscetibilidade *in vitro*.^{4,10} Este fenômeno é dependente de fatores como o próprio microorganismo, o perfil de suscetibilidade, epidemiologia, fenótipos de resistência e métodos de avaliação.¹⁵ Alguns trabalhos descrevem esse tipo de resistência sem especificar um intervalo de concentração do antibiótico, já outros relatam a presença da heterorresistência quando há o crescimento de subpopulações de um isolado em concentrações maiores do que aquelas encontradas nos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), porém dentro da faixa de suscetibilidade.^{20,22} Assim, ao fenômeno da heterorresistência ainda associam-se problemas de definição, métodos de detecção e frequência, sendo o seu significado clínico indeterminado.¹¹ O fenômeno pode ocorrer tanto em Gram-positivos quanto em Gram-negativos para diferentes antimicrobianos e vários fatores podem, posteriormente, levar à proliferação da subpopulação resistente e o aparecimento de uma cepa totalmente resistente.¹¹ Este fenótipo de resistência pode representar uma forma para a evolução natural à resistência aos antibióticos, já que permite à bactéria a possibilidade de crescimento na presença dos antibióticos após a aquisição da resistência pela maior proporção da população microbiana.¹¹ Alguns autores sugerem que este fenótipo poderia ser um dos motivos para a ocorrência das falhas terapêuticas.¹⁵ Heterorresistência às polimixinas não havia sido descrita até pouco tempo atrás, a partir de quando vem sendo relatadas ocorrências em diversas bactérias patogênicas.^{9,20,23} Seu surgimento é comumente associado à exposição a dosagens subótimas de polimixina, onde o antimicrobiano atuaria como agente de seleção eliminando a população mais sensível, mas seu impacto clínico e seu mecanismo de ação também carecem de maiores estudos.^{10,23}

A ocorrência de heterorresistência pode ser indicada pela presença de colônias dentro do halo de inibição do crescimento, quando se usam fitas *Etest*® ou disco-difusão, porém não pode ser detectada pelos métodos de diluição padrão usados na determinação da CIM.^{17,23} Assim, o método considerado padrão-ouro para a detecção desse fenômeno é a avaliação do perfil populacional (*population analysis profile* – PAP).^{3,11,17,30,37} O PAP é realizado através da inoculação de diferentes diluições do isolado em meio de cultura sólido contendo antibiótico em diferentes concentrações, maiores que a CIM. Desta forma pode-se verificar a

verdadeira CIM da subpopulação em análise.³ A variedade dos métodos de rastreio utilizados faz a interpretação das estatísticas de prevalência difícil e por isso os resultados dos estudos de heterorresistência tem se mostrado variáveis.^{21,23}

Em 2013, a heterorresistência à polimixina B foi avaliada no estudo de El-Halfawy e Valvano, no qual uma cepa de *Burkholderia cenocepacia* foi utilizada para investigar as implicações da heterogeneidade na resposta frente à polimixina B e outros antibióticos. No trabalho, pode-se observar que as subpopulações mais resistentes comunicavam um nível de resistência àquelas subpopulações menos resistentes do mesmo isolado ou outras espécies simultaneamente cultivadas. Essa comunicação seria realizada através de sinais químicos capazes de sequestrar moléculas anfifílicas contendo cadeiras de ácidos graxos, como o peptídeo polimixina B. Trata-se de uma nova proposta de mecanismo de comunicação química e não-genética entre as colônias de *B. cenocepacia*.⁹

Em 2010, Meletis *et al* realizaram estudo com amostras de *K. pneumoniae* heteroresistentes a colistina. Foi relatado que de 16 amostras sensíveis ao polipeptídeo (MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$), 12 carregaram subpopulações heterorresistentes que cresceram em até 8 $\mu\text{g/ml}$ de colistina, sendo que 11 mantiveram suas MIC altas (> 8 $\mu\text{g/ml}$) após passagem em meio livre de antibiótico.²⁴

Também em 2010, a presença da heterorresistência não em polimixinas, mas sim frente a um carbapenêmico em isolados de *Klebsiella pneumoniae* foi descrita no trabalho de Pounaras *et al*. No estudo, amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC revelaram que uma proporção dos inóculos iniciais consistiam de subpopulações heterorresistentes que cresceram em concentrações de meropenem consideravelmente mais altas, mas que não se mantiveram estáveis após cultura em meio sem antibiótico. O fenômeno poderia ser atribuído a uma superexpressão temporária do gene $\text{bla}_{\text{KPC-2}}$, a um inóculo bacteriano muito concentrado ou outros mecanismos ainda indefinidos.²⁹

Até que o impacto clínico dessas espécies heterorresistentes seja melhor investigado, medidas deverão ser tomadas para evitar a disseminação e/ou emergência dessas cepas heterorresistentes, tais como: instituição de rigorosas políticas de controle de infecção, desenvolvimento de métodos de detecção mais rápidos e maior prudência na administração das antibioticoterapias.¹¹

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do fenômeno de heterorresistência em amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) isoladas de paciente hospitalizada em tratamento com polimixina B.

4. METODOLOGIA

4.1. Caso clínico e amostras

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* utilizados no presente trabalho são provenientes de amostras de hemocultura, coletadas de paciente internada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A paciente feminina de 18 anos, submetida a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas por leucemia mielóide aguda, foi internada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do hospital devido à choque séptico decorrente de complicação de neutropenia febril. Fez uso escalonado de cefepima (6 dias), piperacilina-tazobactama (3 dias) e no momento da internação em UTI estava em tratamento com meropenem e vancomicina há 4 dias antes da primeira hemocultura positiva. Um dia após colheita da primeira hemocultura, foi iniciado polimixina B intravenosa na dose de 2,5 mg/kg/dia dividido em administrações de 12/12h, manteve-se o meropenem 2g intravenoso (IV) de 8/8h e no quarto dia após a colheita (já conhecendo resultado dessa hemocultura) associou-se ainda amicacina IV na dose de 20 mg/kg/dia uma vez ao dia. Após segundo grupo de hemoculturas positivas, foi retirado meropenem e associado tigeciclina em doses altas (200 mg IV dose de ataque + 100mg 12/12h). A paciente foi a óbito após a última coleta de hemocultura.

A equipe responsável colheu amostras de sangue em 3 diferentes dias, o que resultou em 7 amostras para estudo, sendo uma amostra do primeiro dia (Kp_{1.1}), três do segundo dia (Kp_{2.1}, Kp_{2.2}, Kp_{2.3}) e três do terceiro dia (Kp_{3.1}, Kp_{3.2} e Kp_{3.3}). As outras 2 amostras do primeiro dia não foram incluídas no estudo pois não foram recuperadas no laboratório de microbiologia do HCPA. Foram isoladas cepas de *Klebsiella pneumoniae* de todas as 3 amostras (Tabela 1). Em função do início da terapia com polimixina B da paciente, as amostras correspondentes aos dois últimos dias já haviam entrado em contato com o antibiótico, ao contrário da primeira amostra. As amostras tiveram as suas espécies identificadas bioquimicamente através de métodos de rotina utilizados no laboratório de Microbiologia do HCPA. A primeira amostra, Kp_{1.1}, foi caracterizada como resistente a carbapenênicos no mesmo laboratório, através de análise de sensibilidade frente a discos de imepenem e meropenem e então enviada para o nosso Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) para identificação do gene de resistência associado. As amostras das

coletas do 2º e 3º dias foram então recuperadas e todas foram armazenadas em caldo glicerol 16% em freezer a -80° C até a realização dos testes.

Tabela 1. Amostras de *K. pneumoniae* utilizadas no estudo.

Coleta	27/03/2014	02/04/2014			03/04/2014		
Amostra	Kp _{1.1}	Kp _{2.1}	Kp _{2.2}	Kp _{2.3}	Kp _{3.1}	Kp _{3.2}	Kp _{3.3}
Tratamento com polimixina B	Não	Sim			Sim		

4.2. Identificação

Séries bioquímicas foram realizadas com todas as amostras clínicas. A identificação das espécies bacterianas foi confirmada por técnica de sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S segundo Such *et al* (2002), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e as sequências de DNA foram analisadas utilizando o programa BLAST.

4.3. Caracterização molecular

A pesquisa da presença dos genes codificadores de carbapenemases foi realizada utilizando a tecnologia de curva de desnaturação de alta resolução por multiplex PCR em Tempo Real segundo Monteiro *et al* (2012), utilizando *primers* para *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}.

A relação clonal foi estabelecida pela técnica de macrorestrição de DNA seguida por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), utilizando o equipamento CHEF DRII (Bio-Rad), por fim realizando análise visual dos perfis de bandas obtidos, utilizando o critério de Tenover *et al.* (1995).

Para a realização do ensaio de PFGE foi utilizada a enzima de restrição XbaI (Invitrogen™) e as seguintes condições de corrida: tempo de corrida de 23h, tempo de início de 5s, tempo final de 30s, voltagem de 5,9 volts/c, ângulo de 120° e temperatura de 12°C.

4.4. Teste de suscetibilidade

A avaliação da atividade antimicrobiana da polimixina B foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2014). As amostras foram classificadas como sensíveis ou resistentes à polimixina B utilizando como base os *breakpoints* recomendados pelo CLSI para isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., nos quais CIMs às polimixinas menores ou iguais a 2 µg/ml são considerados sensíveis.^{17,40}

Utilizando uma placa de 96 poços, 50 µl de caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado foram pipetados nos poços numerados de 3 a 11, depositando 100 µl no último poço, o qual representava o controle negativo. Em seguida, pipetou-se 100 µl da polimixina B no 2º poço e diluiu-se seriadamente em 10 vezes sua concentração nos poços seguintes para obter concentrações finais que variam de 64 a 0,125 µg/mL. Por fim, foram preparados os inóculos de cada amostra na concentração correspondente a 0,5 da escala de McFarland (1 a 2 x 10⁸ UFC/mL) com o auxílio de um turbidímetro e em solução salina. Cada uma dessas suspensões foram diluídas em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado na proporção de 1:100, correspondendo a 1 a 2 x 10⁶ UFC/mL. Cinquenta microlitros da suspensão bacteriana foram inoculadas nos poços 2 ao 11 da placa, sendo que no primeiro poço foram pipetados 100 µl (controle positivo). Para o controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 25922 de *Escherichia coli*, seguindo critérios estabelecidos pelo documento do CLSI (2014).

O resultado da CIM foi analisado após incubação em estufa a 37°C, de 18 a 22 horas, por inspeção visual e definido pela concentração do primeiro poço que não apresentasse crescimento visível.

Também foram realizados ensaios de suscetibilidade em disco difusão para algumas amostras, utilizando discos de imipenem e meropenem, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – 2014).

4.5. Etest®

Foi realizado teste de suscetibilidade pela técnica de fita Etest® (bioMérieux) para todas as amostras clínicas, utilizando fitas de 16 antibióticos: fosfomicina, cefepima,

gentamicina, doripenem, cloranfenicol, amicacina, ceftazidima, ciprofloxacino ceftriaxone, aztreonam, imipenem, meropenem, tigeciclina, cefuroxima, piperacilina-tazobactama e ampicilina. A fita *Etest*® foi utilizada conforme instruções do fabricante (bioMérieux).

4.6. Ensaio de heterorresistência

Para cada isolado foram preparadas diferentes concentrações de inóculos em solução salina, variando de 10^8 UFC/mL (0.5 de McFarland) a 10^2 UFC/mL. Vinte microlitros de cada inóculo foram pipetados em placas de ágar Mueller-Hinton contendo diluições seriadas de polimixina B em uma faixa de concentração de 0,25 a 16 μ g/mL, além da placa zero, que não continha antibiótico. As placas foram incubadas em estufa a 37° C e o crescimento de colônias foi avaliado após 24h e 48h. A análise foi realizada em duplicata para cada isolado e a frequência de aparecimento das subpopulações heterorresistentes foi calculada dividindo o número de colônias viáveis na presença de antibiótico (crescimento na placa de maior concentração do antibiótico) pelo número de colônias viáveis na ausência de antibiótico, para cada isolado. Para cada subpopulação que cresceu em altas concentrações do antibiótico, foram selecionadas colônias para subcultivo por 4 dias em meio livre de polimixina B antes de testar as CIMs das mesmas.

5. RESULTADOS

O perfil de sensibilidade à polimixina B e outros antibióticos dos isolados analisados encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para polimixina B obtidas por microdiluição em caldo das amostras originais

Coleta	27/03/2014	02/04/2014			03/04/2014		
Amostra	Kp _{1.1}	Kp _{2.1}	Kp _{2.2}	Kp _{2.3}	Kp _{3.1}	Kp _{3.2}	Kp _{3.3}
CIM	0,25	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	8	16	16	16

Kp_{1.1}: primeiro isolado, sem tratamento com polimixina B; Kp_{2.1}, Kp_{2.2} e Kp_{2.3}: amostra do 2º dia de coleta, já com tratamento de polimixina B; Kp_{3.1}, Kp_{3.2} e Kp_{3.3}: amostras do 3º dia de coleta ainda em tratamento com polimixina B.

Tabela 3. Valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para outros antimicrobianos obtidas através de *Etest*® das amostras originais.

	Antibióticos															
	FOS	CPM	GEN	DOR	CL	AMK	TAZ	CIP	CTR	AZM	IMI	MER	TCG	CFX	PTc	AMP
Kp_{1.1}	48	192	96	≥ 32	≥ 256	3	16	≥ 32	≥ 32	NR	≥ 32	≥ 32	1,5	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Kp_{2.1}	≥ 1024	≥ 256	96	≥ 32	24	24	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	6	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Kp_{2.2}	≥ 1024	≥ 256	≥ 256	≥ 32	24	16	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	6	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Kp_{2.3}	≥ 1024	≥ 256	96	≥ 32	16	16	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	3	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Kp_{3.1}	≥ 1024	≥ 256	≥ 256	≥ 32	16	16	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	4	≥ 256	≥ 256	NR
Kp_{3.2}	≥ 1024	≥ 256	96	≥ 32	24	16	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	6	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Kp_{3.3}	≥ 1024	≥ 256	≥ 256	≥ 32	24	16	≥ 256	≥ 32	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32	4	≥ 256	≥ 256	≥ 256
FS	S ≤ 64 R ≥ 256	S ≤ 2 R ≥ 16	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 1 R ≥ 4	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 16 R ≥ 64	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 1 R ≥ 4	S ≤ 1 R ≥ 4	S ≤ 4 R ≥ 16	S ≤ 1 R ≥ 4	S ≤ 1 R ≥ 4	*S ≤ 1 *R ≥ 4	S ≤ 8 R ≥ 32	S ≤ 16 R ≥ 128	S ≤ 8 R ≥ 32

ATB: antibiótico; FOS: fosfomicina; CPM: cefepime; GEN: gentamicina; DOR: doripenem; CL: cloranfenicol; AMK: amicacina; TAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; CTR: ceftriaxone; AZM: aztreonam; IMI: imipenem; MER: meropenem; TCG: tigeciclina; CFX: cefuroxima (parenteral); PTc: piperacilina-tazobactama; AMP: ampicilina; NR: não realizado; FS: faixa de sensibilidade preconizadas pelo CLSI e *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).; S: sensível; R: resistente.

No ensaio de heterorresistência realizado com a 1ª amostra coletada, sensível à polimixina B, e com a 2ª amostra coletada em triplicata (com perfil conflitante) foram

encontradas subpopulações resistentes para as 4 amostras: Kp_{1.1H} (6 µg/mL) e Kp_{1.1H'} (1 µg/mL), Kp_{2.1H} (16 µg/mL), Kp_{2.2H} (8 µg/mL) e Kp_{2.3H} (64 µg/mL).

As CIMs destas novas amostras heterorresistentes foram realizadas após semeadura em meio livre para avaliação da estabilidade da resistência, em que ainda obtiveram-se concentrações altas, em sua maioria resistentes (CIM > 2), entre 1 µg/mL e 64 µg/mL, como pode ser acompanhado na Tabela 4.

O gene da carbapenemase *bla*_{KPC-2} foi identificado em todas as 7 amostras originais.

Através da análise das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene 16S ribossomal foram observadas duas espécies diferentes de *Klebsiella* spp., no qual o isolado Kp_{1.1} foi caracterizado como sendo *K. oxytoca* e os demais isolados originais (Kp_{2.1} e Kp_{3.3}) como *K. pneumoniae*. A avaliação da série bioquímica forneceu os mesmos resultados acima. Para fins de exclusão da hipótese de contaminação das amostras pela *K. oxytoca*, testes de sensibilidade a meropenem e imepenem por disco difusão foram realizados com a amostra Kp_{1.1} e suas respectivas subpopulações heterorresistentes - Kp_{1.1H} e Kp_{1.1H'} - as quais demonstraram serem resistentes aos carbapenêmicos. Também foi realizado série bioquímica da amostra Kp_{1.1H} e série bioquímica mais sequenciamento do gene 16S de Kp_{1.1H'}, confirmando que a primeira pertence a espécie *K. pneumoniae* e a segunda trata-se de uma *K. oxytoca*.

A relação clonal entre as amostras clínicas e suas respectivas colônias heterorresistentes foi observada através da técnica de PFGE. Verificou-se que as amostras Kp_{1.1} e Kp_{1.1H'} apresentaram perfil clonal A e todos isolados entre Kp_{2.1} e Kp_{3.3}, incluindo subpopulações heterorresistentes, apresentaram perfil B, como pode ser observado na Figura 1.

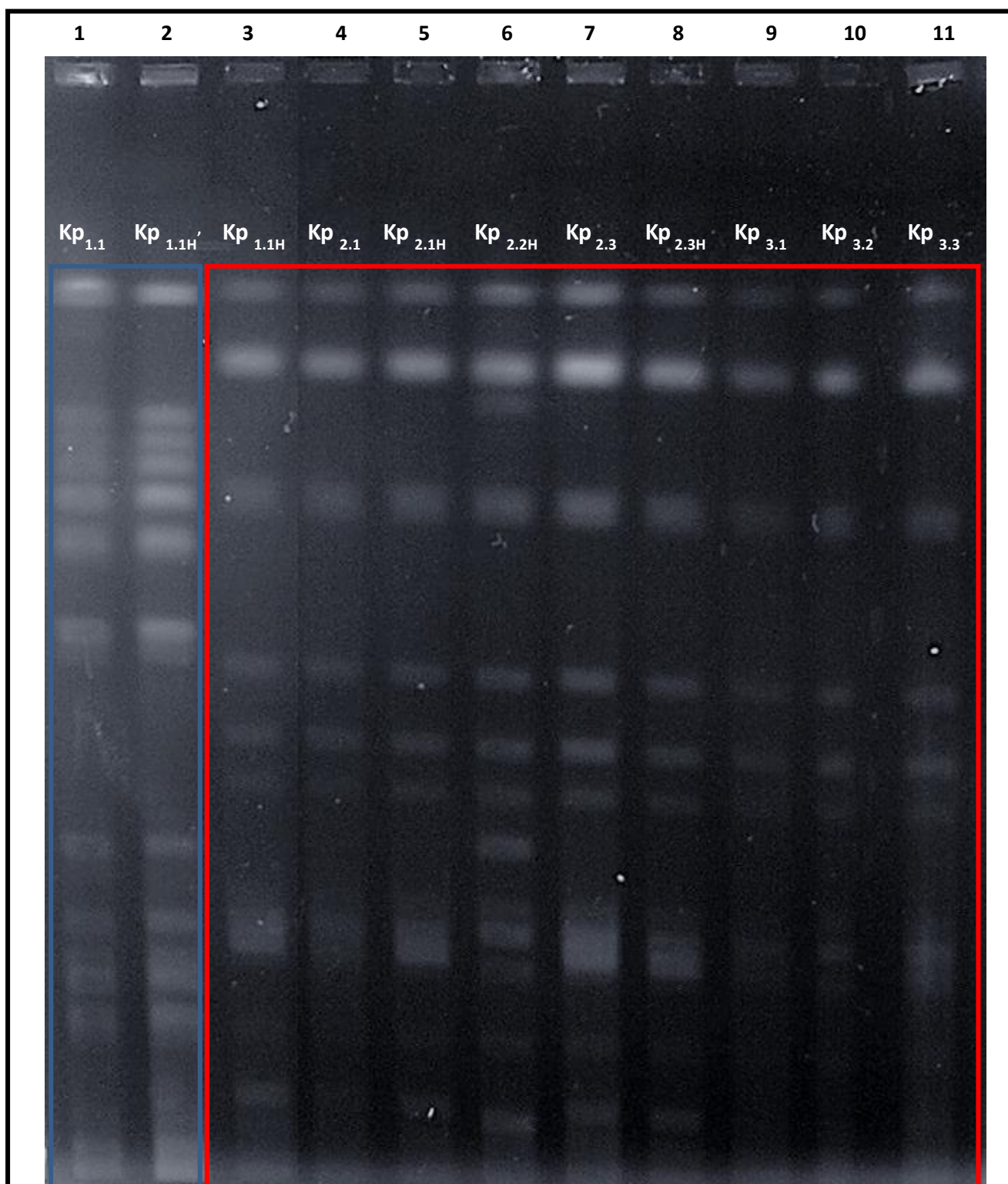


Figura 1. Gel obtido pela técnica de PFGE. 1: 1ª amostra (27/03/2014), sem tratamento com polimixina B; 2: colônia heterorresistente obtida de 1, a qual cresceu em 1 µg/mL; 3: colônia heterorresistente isolada de 1, a qual cresceu em 6 µg/mL; 4 e 5: amostra do 2º dia de coleta (02/04/2014) com tratamento de polimixina B e sua colônia heterorresistente isolada, a qual cresceu em 16 µg/mL, respectivamente; 6: colônia heterorresistente isolada de Kp2.2 (não consta na figura. Mesmo perfil kp2.2), a qual cresceu em 8 µg/mL; 7 e 8: amostra do 2º dia de coleta (02/04/2014) com tratamento de polimixina B e sua colônia heterorresistente isolada, a qual cresceu em 64 µg/mL, respectivamente; 9, 10 e 11: amostras do 3º dia de coleta (03/03/2014), com tratamento de polimixina B.

Também foram calculadas as frequências das subpopulações heterorresistentes de *K. pneumoniae*, as quais foram de **0,00001% a 0,0045%**. Os resultados de identificação, CIMs, heterorresistência e perfil clonal podem ser melhor visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos para os isolados de *Klebsiella* spp.. As CIMs de polimixina B obtidas após 4 dias de passagem em meio sem antibiótico das amostras Kp_{3,1}, Kp_{3,2} e Kp_{3,3} são repetições das CIMs obtidas inicialmente, já que não foi analisado PAP nas mesmas.; para as demais amostras essas CIMs referem-se às amostras obtidas no ensaio de PAP (respectivas subpopulações heterorresistentes).

Amostra	Espécie	Perfil no PFGE	CIM POLB original (µg/mL)	Amostra obtida no ensaio de PAP	Perfil no PFGE	Maior concentração onde ocorreu crescimento no PAP (µg/mL)	Frequência (%) de aparecimento de subpopulações (PAP)	CIM POLB após 4 dias de passagem diária em meio sem ATB (µg/mL)
Kp _{1,1}	<i>K. oxytoca</i>	A	0,25	Kp _{1,1H}	B	6	NA	32
				Kp _{1,1H'}	A	1	NA	1
Kp _{2,1}	<i>K. pneumoniae</i>	B	≤0,125	Kp _{2,1H}	B	16	0,00001	64
Kp _{2,2}	<i>K. pneumoniae</i>	B	≤0,125	Kp _{2,2H}	B	8	0,0045	16
Kp _{2,3}	<i>K. pneumoniae</i>	B	8,0	Kp _{2,3H}	B	64	0,000025	32
Kp _{3,1}	<i>K. pneumoniae</i>	B	16,0	NA	B	NA	NA	8
Kp _{3,2}	<i>K. pneumoniae</i>	B	16,0	NA	B	NA	NA	32
Kp _{3,3}	<i>K. pneumoniae</i>	B	16,0	NA	B	NA	NA	4

POLB, polimixina B; PAP, *population analysis profiles*; NA, não aplicável; ATB, antibiótico.

6. DISCUSSÃO

A ocorrência da heterorresistência à polimixina B em isolados de *K. pneumoniae* pode ser observada neste estudo, pois foram detectados crescimentos em concentrações maiores do que 2 µg/mL no respectivo ensaio, para todas as amostras de *K. pneumoniae* analisadas. As CIM obtidas das subpopulações resistentes foram até 9 vezes maiores quando comparadas com as CIM das populações originais. As CIMs elevadas das subpopulações permaneceram altas após cultura em meio livre de antibiótico por 4 dias, sugerindo o envolvimento de bases moleculares relacionadas aos genes de resistência da bactéria, que proporcionariam a estabilidade do fenômeno.⁴

Em teoria, o aparecimento da resistência ao antimicrobiano em isolado previamente sensível pode ocorrer devido à emergência de resistência na mesma cepa, ou reinfecção por cepa distinta da mesma espécie que seja previamente resistente, onde a heterorresistência poderia estar associada em ambos os casos, pela pressão seletiva da presença do antibiótico.¹⁹ A significância clínica do aumento das CIMs à polimixina B ainda não é clara, pois existem poucos relatos do fenômeno ocorrer *in vivo* durante o tratamento.¹⁹ Porém, foi possível observar e acompanhar uma relação entre o aparecimento de subpopulações heterorresistentes, a disseminação dos mesmos nos isolados até atingir uma resistência estável com provável contribuição para a deterioração do quadro clínico da paciente.

Uma das estratégias sugeridas para prevenir o aparecimento de subpopulações heterorresistentes tem sido o uso de terapia combinada.^{1,7,8,11,19,38} Em nosso estudo, pode-se verificar que *in vivo* esta estratégia não impediu o aparecimento do fenômeno. Isto pode ser explicado em parte pelas CIMs elevadas para meropenem e, possivelmente, tigeciclina (usados todos em combinação) já no isolado inicial. Excetua-se amicacina (CIM=3 µg/mL) em que havia sensibilidade no isolado inicial. Notou-se também elevação das CIMs para amicacina e tigeciclina, nas amostras subseqüentes.

No presente trabalho também se pode constatar que a paciente estava co-infectada com duas espécies diferentes do gênero *Klebsiella spp.*, onde a *K. oxytoca* originária da primeira amostra foi suscetível ao tratamento com polimixina B e tornou possível a emergência da espécie *K. pneumoniae* também ali presente, a qual continuou sendo isolada nas coletas subseqüentes. A exclusão da hipótese de contaminação ou erro na realização do experimento

do PFGE em relação a esta primeira amostra Kp_{1.1} foi comprovada da seguinte forma: primeiramente, o ensaio de suscetibilidade a carbapenêmicos por disco-difusão indica que tanto Kp_{1.1} como as suas respectivas subpopulações heterorresistentes Kp_{1.1H} e Kp_{1.H'} eram resistentes a imipenem e meropenem, tornando pouco provável a contaminação da amostra de hemocultura ou placa de semeadura com outra amostra igualmente resistente a carbapenêmicos; já no ensaio de heterorresistência, no qual 2 subpopulações foram isoladas a partir de Kp_{1.1}, a subpopulação Kp_{1.H'} que cresceu na concentração de 1 µg/mL apresentou o mesmo perfil clonal de Kp_{1.1}, enfraquecendo a hipótese de erro no momento de preparo da amostra original já que a subpopulação heterorresistente apresentou relação clonal com o primeiro isolado, além disso, no caso de presença de contaminante, esta última não teria predominado sobre a população original na primeira amostra Kp_{1.1}, pois tal achado é pouco provável de ocorrer.

A emergência de enterobactérias produtoras de carbapenemases trata-se de um grave problema de saúde pública mundial, visto que são escassas as opções terapêuticas, principalmente em casos de resistência a polimixinas.⁸ Ressalta-se a importância da detecção dessas cepas resistentes e mesmo heterorresistentes em âmbito laboratorial, assim como também se faz urgente a necessidade de definição de CIMs para polimixinas em enterobactérias, a fim de definir com maior segurança a linha de tratamento necessário, evitando desfechos clínicos como o apresentado neste trabalho.^{2,32} É claro que a detecção de subpopulações heterorresistentes ainda carece de métodos padronizados, especialmente no caso de polimixinas em função de sua estrutura molecular, e para tanto mais estudos devem ser encorajados e conduzidos.^{8,18,23}

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, este trabalho foi capaz de demonstrar o aparecimento de heterorresistência à polimixina B em isolados de *K. pneumoniae*, fenômeno pouco relatado em estudos anteriores¹⁹, principalmente no que se refere ao antibiótico específico e ao gênero da amostra. Ainda são necessários mais estudos que possam demonstrar claramente a ocorrência do fenômeno na vigência de tratamento com polimixina B – *in vivo* e *in vitro* – assim como seus possíveis mecanismos moleculares envolvidos e repercussão clínica.⁴

Portanto, para complementação dos resultados obtidos neste trabalho, as amostras serão submetidas a outras análises que permitem a observação da regulação do sistema de dois componentes que modifica a suscetibilidade das bactérias frente às polimixinas, a fim de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no aparecimento das citadas subpopulações heterorresistentes.

8. REFERÊNCIAS

1. AH, Y.-M.; KIM, A.-J.; LEE, J.-Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 1, p. 8-15, July 2014.
2. ANDERSON KF, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.
3. BARIN J: **Avaliação da heterorresistência e resistência adaptativa a polimixina b em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos**. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, Rs/Brasil.
4. BARIN J, et al. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 2, p. 12-15, 2013.
5. BRADFORD PA, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM beta-lactamases in New York City. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 1, p. 55-60, 2004.
6. BRATU S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 1, p. 128-132, 2005.
7. CAI Y, CHAI D, WANG R, LIANG B, BAI N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1607-1615, 2012.
8. CURRIE, B. The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Infect Disease Special Edition**, v. 15, p. 9-13, 2012.

9. EL-HALFAWY, OM, VALVANO, MA. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.
10. FALAGAS ME, RAFAILIDIS PI, MATTHAIYOU DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resist Updat**, v. 13, p. 132-138, 2010.
11. FALAGAS, ME, et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 2, p. 101-104, 2008.
12. FERNÁNDEZ, L, et al. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 548, p. 3372-3382, 2010.
13. GALES AC, JONES RN, SADER, HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 2070-2074, 2011.
14. GUPTA N, LIMBAGO BM, PATEL JB, KALLEN AJ. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 1, p. 60–67, 2011.
15. HERMES, DM, et al. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem -susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 184-1189, 2013.
16. KWA AL, TAM VH, FALAGAS ME. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. **Ann Acad Med Singapore**, v. 37, n. 10, p. 870-883, 2008.
17. LANDMAN D, et al. Polymyxins Revisited. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, n. 21, p. 449-465, 2008.

18. LANDMAN D, SALAMERA J, QUALE J. Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **J Clin Microbiol**, n. 12, p. 4106-4111, 2013.
19. LEE, J, et al. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **J Clin Microbiol** v. 47, n. 5, p. 1611-1612, 2009.
20. LI, J, et al. Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 2946-2950, 2006.
21. LIU, C, CHAMBERS, HF. *Staphylococcus aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 10, p. 3040-3045, 2003.
22. . LO-TEN-FOE, JR, et al. 2Comparative 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3726-3730, 2007.
23. MARTÍNEZ, LM, Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 26, n. 8, p. 481-484, 2008.
24. MELETIS, G; et al. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 4, p. 946-947, 2011.
25. MONTEIRO J, et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 906-909, 2012.
26. NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, p. 228-236, 2009.
27. NORDMANN P, NAAS T, POIREL L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis** , v. 17, n 10, 2011.

28. PATERSON DL, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Infect Dis.**, v. 39, n. 1, p. 31-37, 2004.
29. POURNARAS, S, et al. Characteristics of Meropenem Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Clinical Isolates of *K. pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 7, p. 2601-2604, 2010.
30. SATOLA SW, FARLEY MM, ANDERSON KF, PATEL JB. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 177-183, 2011.
31. SCHUREK, KN, et al. Involvement of pmrAB and phoPQ in Plymyxin B Adaptation and Inducible Resistance in Non-Cystic Fibrosis Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 10, p. 4345-4351, 2009.
32. SCHWABER MJ, CARMELI, Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. **JAMA**, v. 300, n. 24, p. 2911-2913, 2008.
33. SKIADA, A A, MARKOGIANNAKIS, B A, PLACHOURASC, D, DAIKOS, GL. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 37, p. 187-193, 2011.
34. STORM, DR, ROSENTHAL, L KS, SWANSON, PE. Polymyxin and Related Peptide Antibiotics. **Annu Rev Biochem**, v. 46, p. 723-763, 1977.
35. SUCH J, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. **Hepatology**, v. 36, n. 1, p. 135-141, 2002.
36. VAARA, M. Novel derivatives of polymyxins. **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 6, p. 1213-1219, 2013.
37. YAU W, et al. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Infect**, v. 58, p. 138-144, 2009.

38. ZAVASCKI AP, BULITTA JB, LANDERSDORFER CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 12, p. 133-1353, 2013.
39. ZAVASCKI, AP, GOLDAN, I LZ, LI, J, NATION, RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p. 1206-1215, 2007.
40. CLSI. Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. **CLSI**, Wayne, PA, USA, 2014.
41. Tenover, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria. **J Clin Microbiol**, v.33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.