

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA HETERORRESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA ADAPTATIVA A
POLIMIXINA B EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS
CARBAPENÊMICOS**

JULIANA BARIN

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DA HETERORRESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA ADAPTATIVA A
POLIMIXINA B EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS
CARBAPENÊMICOS

JULIANA BARIN

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Barin, Juliana

Avaliação da heterorresistência e resistência adaptativa a polimixina B em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos / Juliana Barin. -- 2013. 67 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, 2013.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. polimixina B. I. Prehn Zavascki, Alexandre, 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 e por toda a disponibilidade, dedicação, orientação e confiança depositada. Muito obrigada.

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

À professora Dra. Andreza Martins pela oportunidade, conselhos e orientações durante o trabalho.

À bolsista de iniciação científica, Bianca Heineck, pela dedicação e ajuda nos experimentos realizados durante a pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de pesquisa em Doenças Infecciosas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio e colaboração.

Aos centros hospitalares que cederam os isolados clínicos para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

E por fim, à minha família, em especial minha mãe, meu irmão e na memória de meu pai, a quem eu dedico todas as minhas conquistas, pois foi a pessoa que me ensinou a sonhar e em quem eu sempre me inspirei.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Características do gênero <i>Acinetobacter</i> spp.....	11
2.1.1 Taxonomia	11
2.2 Epidemiologia.....	12
2.3 Manifestações Clínicas.....	14
2.4 Opções Terapêuticas.....	15
2.5 Mecanismos de Resistência	16
2.5.1 Resistência aos β -lactâmicos.....	17
2.5.1.1 β -lactamases.....	17
2.5.1.1.1 Oxacilinases.....	18
2.5.2 Alteração de porinas	20
2.5.3 Hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo	20
2.5.4 Alteração de PBPs	21
2.5.5 Mecanismos de Resistência a outros Antimicrobianos	22
2.5.5.1 Tigeciclina	22
2.6 Métodos de Tipagem Molecular.....	23
2.7 Polimixinas.....	24
2.7.1 Mecanismos de ação das polimixinas	26

2.7.2 Mecanismos de resistência às polimixinas.....	27
2.8 Heterorresistência	29
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo principal	34
4.2 Objetivos secundários	34
5 REFERÊNCIAS.....	35
6 ARTIGO	48
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno nosocomial que está envolvido em um amplo espectro de infecções hospitalares. A maior preocupação atual é devido a sua alta capacidade de adquirir mecanismos de resistência, principalmente aos carbapenêmicos, fármacos utilizados normalmente para o tratamento dessas infecções. Desta forma, as opções terapêuticas tornam-se restritas e por isso, as polimixinas (polimixina B e colistina) voltaram a serem utilizadas na prática clínica. A heterorresistência a colistina já foi descrita em estudos recentes com isolados de *A. baumannii* e outros estudos detectaram a presença de resistência adaptativa as polimixinas. O objetivo deste estudo foi investigar a presença do fenômeno de heterorresistência e resistência adaptativa a polimixina B, e avaliar sua estabilidade. A pesquisa foi feita em isolados pertencentes a 15 clones diferentes de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e sensíveis a polimixina B. A avaliação da heterorresistência foi feita através da análise do perfil da população (PAP) para 29 isolados, selecionados aleatoriamente (pelo menos um de cada clone). A indução da resistência foi avaliada para 22 isolados, selecionados aleatoriamente (pelo menos um de cada clone), submetendo os isolados ao cultivo em concentrações crescentes de polimixina B. A determinação da estabilidade das subpopulações e da indução da resistência foi feita através de passagens, em dias consecutivos, em meio livre de antibiótico. Foram consideradas subpopulações heterogêneas aquele isolado que possuía colônias com uma CIM maior do que a população original para polimixina B. A CIM foi reavaliada após 75 e 60 dias de estocagem em -80°C para os isolados que apresentaram subpopulação heterogênea ou indução da resistência para a polimixina B, respectivamente. Dos 29 isolados, submetidos a avaliação da heterorresistência, 26 (90%) apresentaram subpopulações heterogêneas para polimixina B. Nenhum isolado apresentou subpopulação superior a 2 µg/mL para polimixina B, ou seja, não foi encontrado neste estudo subpopulações heterorresistentes. As CIMs das subpopulações heterogêneas permaneceram iguais após os subcultivos em meio livre de antibiótico, mas quando a CIM foi reavaliada depois da estocagem, os valores obtidos foram os mesmos da população original.

Dos 22 isolados submetidos a indução de resistência, 12 (55%) apresentaram algum crescimento até a concentração de 64 µg/mL de polimixina B. Após as passagens em meio livre de antibiótico a CIM diminuiu, voltando a CIM original na reavaliação após a estocagem a -80°C. Este estudo mostra pela primeira vez a avaliação da heterorresistência e indução da resistência para polimixina B em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. O fenômeno de heterorresistência não foi encontrado neste estudo, no entanto, subpopulações com uma CIM maior do que a original foram identificadas em 90% dos isolados. As CIMs das subpopulações permaneceram estáveis após 4 dias de passagens em meio livre de antibiótico, mas retornaram a CIM original após estocagem, o que sugere o envolvimento de mecanismos moleculares neste fenômeno. A presença da resistência induzida a polimixina B foi detectada em 55% dos isolados, sugerindo que este fenômeno pode ser comum entre os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, frente a polimixina B. Embora a presença de subpopulações heterogêneas e a indução da resistência a polimixina B tenha sido comum neste estudo, mais estudos são necessários para um melhor entendimento do significado clínico e das implicações terapêuticas destes dois fenômenos.

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

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um dos principais agentes etiológicos de infecções nosocomiais e está amplamente disseminado em diversos países. A resistência aos antimicrobianos tem sido relatada desde a última década, se tornando um problema crescente na prática clínica. O *A. baumannii* tem capacidade de adquirir mecanismos de resistência, sendo eles, a produção de β -lactamases, a hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo, perda ou redução da expressão de porinas e alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (1).

Devido à emergência destes mecanismos de resistência, principalmente aos fármacos β -lactâmicos, houve a necessidade de resgatar as polimixinas, antigos antimicrobianos que estavam em desuso desde a década de 70, devido à nefrotoxicidade e à neurotoxicidade relacionadas ao seu uso (2). Atualmente, são fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes, e outros bacilos gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (3).

Embora a resistência às polimixinas ainda seja baixa em *A. baumannii*, estudos vem relatando a emergência de isolados resistentes a estes antibióticos e por isso, a compreensão dos seus mecanismos é de extrema importância. Dentre eles, estão envolvidos mecanismos de resistência natural, intrínsecos ao microrganismo, ou resistência adaptativa, adquiridos durante o processo evolutivo (4). Alguns estudos relatam que estes mecanismos resultam das alterações no lipídio A do lipopolissacarídeo bacteriano, presente na membrana externa da bactéria, o que promove a redução da interação do antimicrobiano com a superfície celular (2).

A resistência adaptativa é um fenômeno autoregulado e caracterizado pela indução de resistência na presença do antibiótico, e a reversão para sensibilidade na sua ausência. Diferentemente da resistência genética, por exemplo, que é estável e que surge após alguma mutação cromossômica ou aquisição de elemento genético.

Resistência adaptativa a polimixina B tem sido relatada em alguns bacilos gram negativos, especialmente em *P. aeruginosa* (5,6).

O fenômeno de heterorresistência definido como subpopulações resistentes dentro de uma população sensível, também tem sido descrito em isolados de *A. baumannii* com colistina e carbapenêmicos (7). Entretanto seu significado clínico e as implicações terapêuticas não estão bem elucidados ainda. Estudos relatam que a heterorresistência pode estar associada ao desenvolvimento, posterior, de um isolado totalmente resistente ou até na falha terapêutica (8).

O significado destes dois fenômenos, heterorresistência e resistência induzida, são necessários para uma melhor compreensão da relevância clínica e implicações terapêuticas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil epidemiológico e molecular associado com o fenômeno de heterorresistência e a resistência induzida à polimixina B em isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características do gênero *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* spp. está classificado na família *Moraxellaceae*, compreende em cocobacilos gram-negativos, não fermentadores da glicose, imóveis, oxidase-negativa, catalase-positiva, aeróbios estritos e não esporulados, geralmente aparecem em forma diploide ou em cadeias de comprimento variável. No meio de cultura Ágar sangue as colônias podem ser observadas opacas ou translúcidas e convexas, e a maioria das espécies crescem em Ágar MacConkey produzindo colônias com uma fraca coloração rosa, correspondente à utilização da lactose tardiamente (1,9).

2.1.1 Taxonomia

O gênero *Acinetobacter* spp. foi descrito pela primeira vez no início do século 20, em 1911, quando um microbiologista holandês, Beijerinck, descreveu um organismo chamado *Micrococcus calcoaceticus*. Este micro-organismo passou por diversas mudanças taxonômicas, recebendo pelo menos 15 diferentes denominações, entre as quais as mais conhecidas estão *Diplococcus mucosus*, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Alcaligenes haemolysans*, *Moraxella lwoffii*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum*, e *Achromobacter mucosus* até 1971, o ano que ocorreu oficialmente o reconhecimento do gênero *Acinetobacter* spp.(1,9).

A espécie *A. baumannii* foi descrita em 1986 por Bouvet e Grimont e está compreendida no complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, que inclui quatro espécies diferentes: *A. pittii* (genoespécie 3), *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU), *A. calcoaceticus* (genoespécie 1) e *A. baumannii* (genoespécie 2). A maioria das

doenças são causadas por estas quatro genoespécies, que são fenotipicamente similares, por isso estão agrupadas no mesmo complexo (1).

A identificação de espécies do gênero *Acinetobacter* spp. é baseada em testes fenotípicos é muito difícil, por este motivo não é possível identificá-las em laboratórios de rotina, exceto laboratórios de referência que realizam testes genotípicos (hibridização de DNA). Assim, a maioria dos laboratórios identifica as quatro diferentes espécies do complexo como *A. baumannii*, que é a espécie de maior importância clínica do complexo (10).

2.2 Epidemiologia

A. baumannii pode ser encontrado no solo, água, animais e seres humanos, sendo cosmopolita na natureza. São habitantes normais da pele de pessoas da comunidade, geralmente não causando infecções, podendo ser considerado não patogênico, nestes casos. Entretanto, são frequentemente isolados do trato respiratório de pacientes hospitalizados e podem causar graves infecções nestes indivíduos. *A. baumannii* acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos que estão internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), Unidades de Queimados e pacientes que se submeteram a procedimentos invasivos (11,12).

Estudos de análise multivariada demonstram que a taxa de mortalidade de pacientes infectados por *Acinetobacter* multirresistentes internados em UTIs é alta, podendo variar de 26% a 68% (13–15). A alta taxa de mortalidade pode estar associada com o grau de resistência aos antimicrobianos, a eficácia e a disponibilidade terapêutica. Um estudo realizado na Coreia identificou que a administração terapêutica incorreta para bacteremias causadas por *Acinetobacter* foi um fator preditor independente de mortalidade (15).

Este micro-organismo pode ser encontrado em objetos hospitalares animados e inanimados e tem como característica a capacidade de sobreviver por bastante tempo, devido à manifestação de fatores de virulência e a sua escassa exigência

nutricional. Devido a capacidade de sobreviver por longo período no ambiente pode ocorrer a formação de biofilme, provavelmente regulada pela atividade dos genes *quorum-sensing* (16)

A. baumannii já foi isolado de bancadas, ventiladores, colchões, travesseiros, umidificadores, equipamentos de aspiração, recipientes de água destilada, jarros de coleta de urina, botões de eletrocardiógrafos, lavatórios, bombas de infusão, pias, chuveiros, carrinhos de aço inoxidável, equipamentos de reanimação, roupas de cama, dispensadores de sabão e aventais (17). E sua transmissão pode ser pelo contato direto ou indireto, ou ainda por via aérea (18).

A. baumannii está diretamente relacionado com surtos de infecções hospitalares, devido sua grande capacidade de adquirir mecanismos de resistência. Em 2004, Van Dessel *et al.* mostraram que três grandes clones epidêmicos europeus (EU) de *A. baumannii* foram reconhecidos. Os clones I e II foram responsáveis por surtos em hospitais de países do noroeste da Europa. O clone I também foi encontrado na Espanha, África do Sul, República Checa, Polónia e Itália, enquanto o clone II foi encontrado na Espanha, Portugal, África do Sul, França, Grécia e Turquia. O clone III foi identificado na França, Itália, Espanha e Holanda (19–21). Em estudo recentemente publicado, foi identificada a presença dos clones EU I, II e III fora do continente Europeu, associados à presença da enzima OXA-carbapenemase (22).

Estudos recentes têm mostrado que *A. baumannii* também pode ser encontrado em fontes insuspeitas, como alimentos. O estudo de Berlau *et al.* (23) mostrou que *A. baumannii* foi isolado de diferentes alimentos, como maçã, feijão, couve-flor, cenoura, batata, alface, pepino, pimentão, cogumelo e milho (24). Além disso, recentemente, infecções causadas por *A. baumannii* foram identificadas em pacientes com lesões traumáticas, sugerindo contaminação ambiental da ferida (25).

Infecções associadas a catástrofes e guerras podem ocorrer, como na ocasião do terremoto de Marmara em 1999, na Turquia (26), e a Guerra do Vietnã, onde o bacilo Gram-negativo mais descrito foi *A. baumannii*, isolado de lesões traumáticas das extremidades, em ambos acontecimentos. Em 2002 ocorreu um fato

semelhante em Bali, após uma operação militar (27). Além disso, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Acinetobacter* MDR, foi descrito em 2006 em soldados das forças canadenses que retornaram ao Afeganistão, feridos criticamente (28).

2.3 Manifestações Clínicas

A. baumannii é caracterizado como um importante patógeno oportunista que causa, geralmente, a maioria das infecções em pacientes criticamente enfermos. Infecções nosocomiais causadas por outras espécies de *Acinetobacter*, como *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* e *A. ursingii* são raras e estão especialmente relacionadas à infecções da corrente sanguínea, principalmente em indivíduos com cateter (29,30).

Dentre as infecções hospitalares mais frequentes associadas a *A. baumannii* estão a pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções da corrente sanguínea, as quais estão associadas à morbidade e mortalidade (31). Um grande estudo de vigilância realizado nos Estados Unidos analisou 1.410.000 isolados associados a infecções hospitalares adquiridas em UTIs durante 1986 a 2003. Os dados revelaram que entre 5 e 10% dos casos de pneumonia adquirida na UTI foram causadas por *A. baumannii*, essa proporção aumentou de 4% em 1986 para 7% em 2003 (32). Entretanto, é possível que em outros hospitais a proporção de pneumonia adquirida na UTI seja muito maior do que a do estudo mencionado.

Em outro estudo de vigilância nos Estados Unidos entre 1995 a 2002, realizado em 49 hospitais, sobre infecção da corrente sanguínea, identificaram *A. baumannii* como o décimo agente etiológico mais comum. *A. baumannii* foi responsável por 1,3% de todas as infecções da corrente sanguínea e teve a terceira maior taxa de mortalidade de pacientes internados na UTI (33).

Estudos recentes demonstraram que a infecção e/ou colonização por *Acinetobacter* spp. está associada com a mortalidade. Em alguns casos a taxa de

mortalidade pode ser de 56% em pacientes gravemente infectados por *Acinetobacter* spp. (34–36).

Há também relatos de infecções adquiridas na comunidade, que geralmente ocorrem em regiões tropicais ou subtropicais, onde é mais quente e mais úmido, o que favorece o crescimento de *A. baumannii* em seus habitats naturais (1). A maior parte dos casos encontrados na literatura associados a infecções adquiridas na comunidade relatam principalmente pacientes associados a fatores subjacentes, como doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal, diabetes mellitus, tabagismo e consumo excessivo de álcool. (1,26).

A. baumannii também pode causar infecções na pele e feridas, meningites e infecções urinárias, doenças que também estão associadas à morbidade e mortalidade (31). Estudo de Gaynes *et al.* (32), demonstra que infecção urinária e infecções de pele e tecidos moles ocorreu em somente 1,6% e 2,1% dos pacientes envolvidos no estudo, respectivamente.

2.4 Opções Terapêuticas

Infecções causadas por *A. baumannii* são geralmente tratadas com ampicilina/sulbactam, fluorquinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos utilizados isoladamente ou em combinação com um aminoglicosídeo (18). Porém entre os anos de 1971 e 1974 ocorreram os primeiros relatos de resistência, incluindo as penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cloranfenicóis e tetraciclina (1,38).

Inicialmente o gênero conservou a susceptibilidade contra as cefalosporinas de terceira e quarta geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos, mas durante os anos de 1980 e 1990 a emergência mundial e a disseminação de isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem fez com que as alternativas terapêuticas ficassem cada vez mais limitadas. Ao final dos anos 1990, os carbapenêmicos foram os únicos antimicrobianos que poderiam combater infecções

graves causadas por *A. baumannii* (1). No entanto, desde o início da década de 90 a resistência aos carbapenêmicos tem sido descrita com maior frequência, desta forma limitando as opções terapêuticas e gerando um grande problema de saúde pública (20,39).

Um estudo conduzido por Lee *et al.* mostrou que a taxa de resistência aos carbapenêmicos, especialmente imipenem, em isolados de *A. baumannii* nos hospitais da Coreia teve um significativo aumento nos últimos anos. Em 1997 a taxa de resistência era de 1%, em 2007 foi 22% e 2009 aumentou para 51% (42).

Recentemente no Brasil, o estudo de Prates *et al.* (40) demonstrou que a taxa de resistência aos carbapenêmicos aumentou de 29,4% para 78%, entre os anos de 2006 e 2008, em um hospital do sul do país, acima da média nacional. No mesmo estudo pode ser observada a alta taxa de mortalidade destes pacientes, que foi de 69,7%. O mesmo fato pode ser observado no estudo de Martins *et al.* (41) em 2012. O estudo descreve uma alta taxa de isolados de *A. baumannii* MDR entre os anos de 2007 e 2008 em 12 hospitais públicos do sul do Brasil.

Geralmente isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos pode ser tratados com tigeciclina. No entanto, já há relatos de resistência a este antimicrobiano e seu uso em alguns casos não é recomendado, como para infecções da corrente sanguínea, assim dificultando o tratamento destas infecções (43,44). Devido a esse fato as polimixinas (polimixina B e colistina) se tornaram a última opção terapêutica para isolados de *A. baumannii* multirresistentes (45).

2.5 Mecanismos de Resistência

A. baumannii pode ser intrinsecamente resistente e apresentar inúmeros mecanismos de resistência adquirida contra quase todos os antimicrobianos disponíveis para o uso terapêutico (18). A resistência adquirida pode ser resultado de alguma mutação ou alteração e/ou aquisição de material genético exógeno do micro-organismo. A resistência pode também emergir durante a terapia,

selecionando um isolado que inicialmente tinha perfil sensível e depois apresenta um perfil resistente. (46).

Os mecanismos de resistência podem ser resultado da baixa permeabilidade da membrana externa, produção de β -lactamases, hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo e inativação enzimática (aminoglicosídeos e quinolonas). Modificações nas proteínas de ligação de penicilina (PBPs) também podem ocorrer, mas pouco se sabe sobre seu papel na resistência aos β -lactâmicos (46).

2.5.1 Resistência aos β -lactâmicos

2.5.1.1 β -lactamases

A produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos fármacos β -lactâmicos, principalmente em *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e outros bacilos gram negativos. Estas são enzimas que rompem o anel β -lactâmico dos fármacos assim desestabilizando-os e fazendo com que estes percam sua ação bactericida, resultando na inativação do antibiótico (47).

Estas enzimas são classificadas de acordo com sua função (classificação de Bush-Jacoby) ou de acordo com sua estrutura (classificação de Ambler). As principais β -lactamases encontradas em *A. baumannii* são as ampicilinase (AmpC), oxacilinases (OXA), metalo- β -lactamases (MBL) e β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Estas podem ser encontradas em genes localizados em plasmídeos ou em cromossomos (48–50).

A classe C de Ambler e grupo 1 de Bush-Jacoby é codificada pelo gene *bla*_{AmpC}, um gene cromossomal em *A. baumannii*, ou seja, a expressão induzível de AmpC não ocorre em *A. baumannii*, diferente de outros bacilos gram negativos que pode ser encontrado no plasmídeo, como em *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, e *P. aeruginosa* onde a expressão de AmpC pode ser

induzível quando expostos a determinados β -lactâmicos, tais como amoxicilina, ampicilina, imipenem, e ácido clavulânico (50). A enzima AmpC confere resistência intrínseca em *A. baumannii* e é regulada pela sequência promotora IS*Aba1* que está associada a sua hiperexpressão, conferindo resistência as cefalosporinas de amplo espectro (1,10).

O grupo de β -lactamases pertencentes a classe A de Ambler são as ESBL. Há poucos estudos sobre estas enzimas em *A. baumannii*, são enzimas mais encontradas na família *Enterobacteriaceae* e em *P. aeruginosa*. Enzimas do tipo TEM-92, TEM-116, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43, CTX-M-15, VEB-1, PER-1 e GES já foram descritas em *Acinetobacter* spp. A expressão destas enzimas confere resistência as cefalosporinas de amplo espectro (1,51,52). Recentemente, foi descrito uma carbapenemase do tipo KPC em *A. baumannii*, inicialmente descrita em *K. pneumoniae*, esta enzima pertence a classe 2f de Bush-Jacoby e A de conforme Ambler (53)(50).

As MBLs são pertencentes ao grupo B de Ambler e a classe funcional 3a de Bush-Jacoby. São enzimas que possuem capacidade de hidrolisar todos os fármacos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam e monobactam. Em 1990, as MBLs foram reconhecidas mundialmente quando ocorreram os primeiros relatos em *P. aeruginosa* e espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de VIM e IMP, se disseminando mundialmente (54,55). As principais MBLs descritas em *A. baumannii* são IMP, SIM, VIM e recentemente NDM-1 (10,56,57).

2.5.1.1.1 Oxacilinases

As β -lactamases mais importantes em *A. baumannii* incluem as OXAs. A denominação oxacilinase está associada à capacidade de hidrolisar a oxacilina como substrato preferencial. As OXA-carbapenemases podem ser tanto intrínsecas como adquiridas, e quando forem adquiridas podem ser cromossomais ou encontradas em plasmídeos (58).

As OXA-carbapenemases são as enzimas mais prevalentes em *A. baumannii* e pertencentes a classe D de Ambler e ao grupo funcional 2d, 2de, 2df de Bush-Jacoby. Em 1985 foi relatada a primeira OXA-carbapenemase em *A. baumannii* do tipo OXA-23, na Escócia, primeiramente chamada de ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*) (59). No Brasil, o primeiro relato desta enzima foi no ano de 2003, em Curitiba (60). E após isso só em 2009 foi descrita no Rio de Janeiro e Porto Alegre (61,62). O grupo OXA-23 podem ser mediadas por plasmídeos ou cromossomos e atualmente estão disseminadas por todo mundo, especialmente na região da Ásia, Europa e América Latina.

Outras OXAs de extrema importância clínica encontradas em *A. baumannii* são: OXA-51, OXA-24/40, OXA-58 e OXA-143 (1). As OXA-carbapenemases hidrolisam fracamente os carbapenêmicos, desta forma nem sempre conferem resistência, entretanto, quando associadas a sequências de inserção podem aumentar sua expressão e demonstrar elevada resistência aos carbapenêmicos, como por exemplo a OXA-51, enzima intrínseca de *A. baumannii*, juntamente com o elemento genético *ISAb_a1* torna o organismo resistente a estes antimicrobianos (10).

Os subgrupos OXA-25, -26 e -72 pertencem ao grupo da OXA-40 e já foram descritas em alguns lugares do mundo. A OXA-24/40 foi descrita nos Estados Unidos e na Europa, as OXAs -25 e -26 são restritas a Europa e a OXA-72 foi relatada na Europa e Ásia (63). E um estudo recente de Werneck *et al.*, relatou a presença de OXA-72 em *A. baumannii* no Brasil (64).

O grupo da OXA-58 já foi relatada em diferentes países, especialmente na Europa, e são mediadas, exclusivamente, por plasmídeos em *A. baumannii*. Foram descritas pela primeira vez por Poirel em 2003, na França (65). Na América do Sul, essa enzima foi descrita na Argentina e no Brasil em 2012, juntamente com a OXA-51 e OXA-65 em *A. baumannii*, conferindo alta resistência a imipenem (66).

A OXA-143 foi relatada pela primeira vez em 2009, no Brasil, em um isolado de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. É considerado o grupo mais recente e sua prevalência ainda não é muito conhecida (67).

2.5.2 Alteração de porinas

As porinas são proteínas localizadas na membrana externa (OMP) da célula bacteriana e atuam como canais para a passagem de pequenas moléculas hidrofílicas. Qualquer variação na sua estrutura pode provocar resistência aos antimicrobianos, pois a perda de porina resulta na diminuição da permeabilidade da membrana, assim dificultando a entrada do fármaco na célula. Estes mecanismos são estratégias de sobrevivência que muitas bactérias desenvolveram (1,68).

A principal OMP descrita em *A. baumannii* é a HMP-AB, com massa molecular de 35,6 kDa (68). A comparação da sequência de HMP-AB com outras OMPs demonstra a homologia com a OmpA do gênero de *Enterobacteriaceae* e OprF de *P. aeruginosa* (46). Estudo de Sugawara *et al.* (69) mostrou que a baixa permeabilidade da OmpA juntamente com a hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo causam elevados níveis de resistência intrínseca a vários antimicrobianos.

Villa *et al.* (68) descreve que a diminuição das porinas de 29 kDa, conhecida como CarO, 33-36 kDa e outra proteína, a 43 kDa, estão associadas a resistência ao imipenem e mereponem em *A. baumannii*. Estas porinas, inicialmente, foram encontradas somente em isolados de *Moraxellaceae* (1). Alguns surtos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram descritos em Nova Iorque e na Espanha, associados a perda de porinas, incluindo a redução da expressão das porinas 47-, 44- e 37-kDa e 22- e 33-kDa estão associadas com OXA-24 (70,71).

2.5.3 Hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo

Os sistemas de bombas de efluxo são responsáveis por expulsar o acúmulo do antibiótico no interior da célula. Este sistema é um mecanismo eficiente para a resistência aos fármacos, e qualquer mutação pode alterar os mecanismos

regulatórios levando a hiperexpressão desta bomba e aumentando ainda mais o nível de resistência (72).

O principal sistema de bomba de efluxo envolvido com a resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicóis e tetraciclinas em *A. baumannii* é o sistema AdeABC pertencente a família RND (*Resistance-Nodulation-Division*) (72,73). O sistema AdeABC é composto por três estruturas: AdeA uma proteína de fusão do interior da célula, AdeB um componente responsável pelo transporte e AdeC uma proteína de membrana externa (10). A hiperexpressão do sistema AdeABC esta associada com os genes *adeR* (regulador da resposta) e *adeS* (sensor da quinase) (1,72,74).

Outros sistemas de efluxo, não associados à resistência aos β -lactâmicos, já foram descritos em *A. baumannii*, como o sistema MFS (*Major Facilitator Superfamily*), envolvido com a resistência a tetraciclina (TetA e TetB) e a minociclina (TetB). Nem TeA e TeB estão associados a resistência à tigeciclina. Outro sistema é o MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*) envolvido com a resistência à quinolonas, gentamicina, canamicina, eritromicina, cloranfenicol e trimetoprim. O sistema BIMP (*Bacterial integral membrane proteins*) contribui para resistência a quinolonas, macrólidos e cloranfenicóis (75).

2.5.4 Alteração de PBPs

As PBPs são encontradas na membrana interna da parede celular bacteriana, são responsáveis por catalisar a polimerização da cadeia de glicano na transglicosilação e a ligação cruzada entre cadeias de glicano, ou seja, regulam a transpeptidação. Desta forma, fornecem forma a célula, que pode ser reproduzida por várias gerações. As PBPs são encontradas de duas formas: alto peso molecular (HMM) e baixo peso molecular (LMM) (76).

Ainda há poucos estudos de PBPs relacionados a resistência aos carbapenêmicos, o que se sabe é que os fármacos β -lactâmicos ligam-se às PBPs,

impedindo a ligação cruzada entre as cadeias do peptidoglicano na transpeptidação, impedindo a formação da parede celular bacteriana (76,77).

Estudo de Fernández-Cuenca *et al.*, em 2003, relatou associação entre resistência aos carbapenêmicos e alterações com as PBPs, observaram doze padrões altamente complexos de PBP e a ausência (ou expressão reduzida) de uma PBP, correspondendo a PBP 2. Este estudo foi comparado com estudo feito com *Proteus mirabilis*, onde também teve ausência da PBP 2 e resistência aos carbapenêmicos (77).

Outro estudo realizado em 2011, por Vashist *et al.*, verificou diminuição da expressão de todas as PBPs exceto as PBPs de 65 e 17 kDa. Estes resultados foram associados com a resistência ao meropenem em *A. baumannii* (78).

2.5.5 Mecanismos de Resistência a outros Antimicrobianos

2.5.5.1 Tigeciclina

A tigeciclina é um antibiótico pertencente a classe das glicilglicinas, descoberta em 1993, que possui um amplo espectro de ação, incluindo isolados multirresistentes, tais como bacilos gram negativos produtores de enzimas β -lactamases de espectro ampliado e *A. baumannii*. Este fármaco foi lançado para uso clínico pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2005, para o tratamento de infecções nos tecidos moles e intra-abdominais. Esse antibiótico é derivado da minociclina e inibe a unidade ribossomal 30S, assim impedindo a incorporação de aminoácidos na cadeia polipeptídica (79).

A tigeciclina pode ser afetada pelo mesmo mecanismo de resistência das tetraciclina, embora a tigeciclina seja muito mais eficaz, devido a sua alta afinidade no sítio de ligação (80). No entanto, altos níveis de resistência à tigeciclina foram observados em isolados de *A. baumannii* multirresistentes, mediados pela aquisição

dos genes *tet* (*tetA-E* e *tetG-L*), os quais codificam bombas de efluxo e por proteínas que protegem o ribossomo (*tetM* e *tetO*) (18).

A tigeciclina é um fármaco que não possui ponto de corte definido pelo CLSI para isolados de *A. baumannii*. Então, o que utiliza-se para estes isolados são os pontos de FDA (*Food and Drug Administration*), considerando CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ sensível e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ resistente, e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility*), considerando CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ sensível e ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ resistente.

A tigeciclina é uma boa opção terapêutica para o tratamento de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos ou quando o paciente é incapaz de tolerar o tratamento com polimixinas ou é resistente a este fármaco.

2.6 Métodos de Tipagem Molecular

Os métodos de tipagem molecular são importantes por contribuírem para o entendimento da epidemiologia de surtos hospitalares, bem como se os isolados são geneticamente relacionados ou não, ou seja, são métodos que estabelecem o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos, assim podendo caracterizar cepas distintas ou clones dentro de uma mesma espécie, auxiliando em estudos que investigam, por exemplo, diferenças entre mecanismos de resistência entre cepas diferentes (clones diferentes). (81).

Os métodos de tipagem bacteriana podem ser fenotípicos ou genotípicos. Diversas técnicas já foram descritas, como ribotipagem, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), AP-PCR (*arbitrarily primed*) e REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic sequence*), e análises do perfil de macrorestrição do DNA seguido de eletroforese em campo pulsado, como a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) Estes métodos podem ser caracterizados conforme seu poder discriminatório e sua reprodutibilidade (82,83).

A técnica de PFGE é um método que envolve a incorporação dos isolados em gel de agarose, lise da célula e digestão do DNA cromossômico com enzimas de restrição específicas (endonucleases). A técnica de PFGE é considerada “padrão-ouro” para tipagem molecular, devido sua reprodutibilidade e seu grande poder discriminatório. É uma metodologia que tem sido usada com sucesso especialmente na investigação de surtos hospitalares (83).

Técnicas de seqüenciamento de DNA como MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) também são utilizadas para tipagem molecular. São técnicas utilizadas como poderosas ferramentas para a tipagem molecular de isolados clínicos, pois apresentam facilidade e rapidez de execução (84).

A tipagem molecular é essencial, principalmente, para a investigação de surtos de isolados clínicos multirresistentes e para estudos que utilizam diferentes clones para investigação de algum mecanismo de resistência, por exemplo; pois desta maneira investiga clones diferentes que não são geneticamente relacionados.

2.7 Polimixinas

Polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos sintetizados naturalmente pelo *Bacillus* spp. Esta classe antimicrobiana é composta por 5 diferentes compostos químicos (A, B, C, D e E), mas somente a polimixina B e E (colistina) são disponíveis para prática clínica, sendo que a colistina é mais amplamente utilizada (2).

Em 1947 a polimixina B foi isolada pelo *Bacillus polymyxa*, por pesquisadores norte-americanos e ingleses, e pela primeira vez disponibilizada para uso terapêutico entre 1950 e 1960 (85). Em 1949 foi descoberta a polimixina E isolada do *Bacillus colistins*, conhecida como colistina, foi usada pela primeira vez no Japão e depois na Europa durante os anos de 1950 e nos Estados Unidos em 1959 (86).

Devido a alta toxicidade, principalmente relacionada com nefrotoxicidade e neurotoxicidade, esta classe antimicrobiana foi abandonada no início dos anos 1980, somente permaneceram na prática clínica para o tratamento de infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística e em soluções tópicas com outros antimicrobianos para o tratamento de infecções oculares (86,87,). Na década de 90, ao emergência de micro-organismos multirresistentes e as limitações terapêuticas fizeram com que as polimixinas retornassem para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (89,90).

As polimixinas tem forma de decapeptídeo policatiônico cíclico e consistem em uma cadeia lateral de ácidos graxos ligada a um anel heptapeptídeo policatiônico. A diferença estrutural entre a colistina e a polimixina B é a presença de um aminoácido diferente na posição 6, D-leucina na molécula de colistina por uma D-fenilalanina na molécula de polimixina B (Figura 1) (2,91).

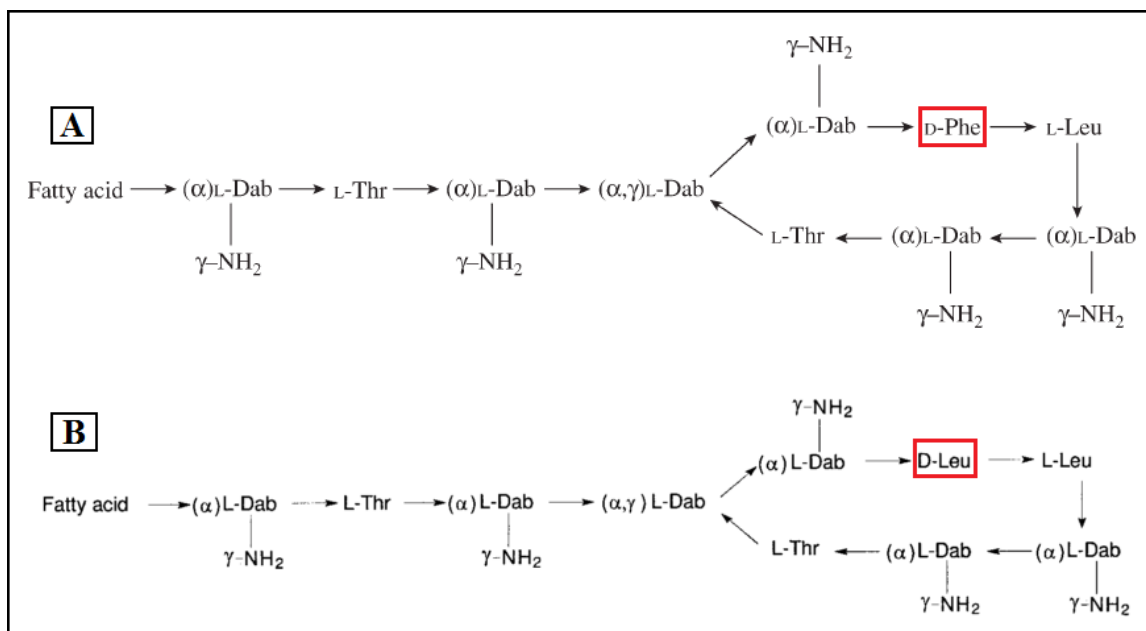


Figura 1. A) Estrutura química da molécula de polimixina B; B) Estrutura química da molécula de colistina.

*Adaptado de Bergen *et al.*, 2006; Zavascki *et al.*, 2007

A polimixina B e E são compostas por uma mistura de pelo menos quatro componentes estritamente relacionados, diferenciados na composição de aminoácidos e ácidos graxos. Os componentes da polimixina B são: B1, B2, B3 e B1-I e polimixina E: E1, E2, E3, E1-I e E1-7MOA. Sendo mais importantes em polimixina B o B1 e B2 e E1 (colistina A) e E2 (colistina B) em colistina (2,3).

Duas formas de colistina estão disponíveis comercialmente para uso clínico: colistina sulfato, utilizada por via oral e relacionada com a descontaminação gastrointestinal, e na forma de colestimetato de sódio, composto por colistina A e colistina B, para uso parenteral e nebulização. Este é considerado menos potente e menos tóxico que a colistina sulfato. A polimixina B é disponível somente na forma de polimixina B sulfato e pode ser utilizada por via parenteral, intratecal e uso tópico (69,78).

As polimixinas são bons fármacos para o tratamento de bactérias gram negativas multirresistentes, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, espécies de *Enterobacter*, *Shigella*, *E. coli* e *Klebsiella*, espécies de *Salmonella*, espécies de *Shigella* e espécies de *Citrobacter*. Entretanto, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Serratia marcescens* possuem resistência intrínseca para a polimixina. Resistência às polimixinas em *A. baumannii* ainda é rara (2,92).

De acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) um isolado de *A. baumannii* com concentração $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ é considerado sensível e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ resistente à polimixina B (3).

2.7.1 Mecanismos de ação das polimixinas

A maior parte das investigações sobre os mecanismos de ação das polimixinas foi realizado com polimixina B, por ser considerada o composto modelo

das polimixinas. Acredita-se que a colistina tenha o mecanismo de ação idêntico da polimixina B, por possuírem estruturas extremamente semelhantes (92).

Polimixinas são antibióticos anfipáticos com ação detergente que atuam na desestabilização da membrana celular externa e citoplasmática bacteriana. Esta classe antimicrobiana tem alto potencial sobre micro-organismos gram-negativos e uma rápida ação bactericida (93).

As polimixinas são agentes catiônicos atraídos pela alta carga negativa da membrana externa celular, onde ficam os lipopolissacarídeos (LPS) que são moléculas aniônicas. O anel de peptídeo policationico das polimixinas liga-se à membrana exterior deslocando os íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} , moléculas que estabilizam o LPS. Neste momento a cadeia lateral de ácidos graxos também interage com o LPS, que contribuem para inserção de antibiótico na membrana externa bacteriana. Este processo resulta no aumento da permeabilidade do envelope celular e subsequentemente a perda dos componentes celulares e a morte celular bacteriana (2,86).

2.7.2 Mecanismos de resistência às polimixinas

Os mecanismos de resistência que atingem a polimixina B e colistina não estão completamente elucidados até o momento. Entretanto, são observados dois tipos de mecanismos de resistência às polimixinas:

- 1) Resistência natural: observado através de alguma alteração no genoma da bactéria ou aquisição de algum elemento genético, produzindo CIMs não tão elevados, geralmente próximas dos seus pontos de corte. A resistência natural é um mecanismo estável (5);
- 2) Resistência adaptativa: observado em bactérias inicialmente sensíveis que desenvolvem resistência após a exposição em crescentes concentrações de polimixinas. Este mecanismo pode gerar isolados com CIMs muito

elevadas, podendo ser maior que 128 µg/mL. A resistência adaptativa é um mecanismo reversível, o isolado bacteriano pode voltar para o fenótipo sensível na ausência do antibiótico (5).

Nas polimixinas o mecanismo de resistência natural e adquirida que estão envolvidos são modificações da membrana externa bacteriana, principalmente através da alteração da porção de LPS, em especial no lípidio A (5,43).

A parte mais externa da parede celular bacteriana nos gram-negativos é composta por uma camada de moléculas de LPS, então qualquer alteração no LPS bacteriano resulta na alteração da carga de superfície da célula bacteriana e a redução da afinidade do antibiótico com a membrana externa da célula. Os LPS são compostos por três regiões: na extremidade interna um lípidio A, no centro um conjunto core de oligossacarídeo e na sua extremidade externa um antígeno O.

As modificações do LPS, que desencadeiam resistência, são conduzidas por sistemas de regulação gênica, que podem ser ativas por fatores ambientais como concentrações elevadas de Ca^+ e baixas de Mg^+ , alterações no pH e a presença de ferro (5).

Várias espécies bacterianas têm desenvolvido diversos mecanismos para a modificação do lípidio A, reduzindo assim sua carga negativa e resultando na resistência as polimixinas (94). Em isolados de *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia pestis* e *E. coli* a resistência as polimixinas esta associada com a adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (LAra4N) no lípidio A. A biossíntese de LAra4N é mediada por PmrA/PmrB (PmrAB) e PhoP/PhoQ (PhoPQ) que são dois componentes de sistemas de regulação (6,95). Sendo que em *S. typhimurium* o gene mig-14 também esta envolvido com a resistência a polimixinas (3).

O sistema PhoPQ é ativado por alterações de pH e alterações nos íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Em *P. aeruginosa* este sistema também induz a transcrição de uma porina OprH. As alterações no sistema PmrAB podem estar relacionadas com a resistência estável as polimixinas, devido a ativação constitutiva do sistema que resulta na modificação permanente do lípidio A (5).

Em *K. pneumoniae*, a presença de cápsula polissacarídica esta envolvida com a resistência as polimixinas além das alterações no LPS pelos sistemas PmrAB e PmrPQ (2). Na espécie *Vibrio cholerae*, a resistência à polimixina é dependente de uma porina OmpU da membrana externa (3).

Em *A. baumannii* os mecanismos envolvidos na resistência as polimixinas não são bem compreendidos. Até o momento somente alterações no operon *pmrCAB* foi descrito. Estes genes compõem um sistema de dois componentes: regulador de resposta (*pmrA*) e sensor de histidina quinase (*pmrB*). Os genes *pmrA* e *pmrB* controlam a expressão do gene *pmrC*. A resistência esta associada com o aumento da expressão do operon *pmrCAB*, em especial o gene *pmrC*, responsável por codificar a proteína que adiciona fosfoetanolamina no lipídio A (96).

Estudo de Moffatt *et al.*, em 2010, observou a perda completa da produção do LPS, promovendo a diminuição da integridade da membrana bacteriana. Esta perda foi resultado da mutação nos 3 primeiros genes da via de biossíntese do lípidos A, o *lpxACD*. O resultado desta mutação levou a mudança do perfil de sensibilidade nos isolados de *A. baumannii* (97).

2.8 Heterorresistência

Entende-se como a resistência expressa por um conjunto de uma população microbiana, definido como subpopulação, que são considerados inicialmente sensíveis a estes antibióticos de acordo com os testes de susceptibilidade. Vários fatores podem, posteriormente, conduzir à proliferação destas subpopulações resistentes e o surgimento de um isolado totalmente resistente. Sendo assim, a heterorresistência pode ser um precursor de fase, que pode ou não levar ao aparecimento resistência (4,98).

A resistência heterogênea ou heterorresistência pode ocorrer tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, para diferentes antimicrobianos.

Estudos em isolados de *A. baumannii* pesquisando heterorresistência em polimixina B, não foram descritos na literatura ainda, somente com colistina. Contudo, isolados que apresentam uma concentração inibitória mínima baixa para a polimixina B ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$, por exemplo) podem conter subpopulações com CIM $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ numa proporção de $1:10^6$ UFC/mL que podem não ser detectadas pelos métodos convencionais de rotina (4,98). Assim, a única forma de detectar a heterorresistência é através da análise das subpopulações resistentes, através da avaliação do perfil populacional (PAP) com a inoculação de diferentes diluições do isolado em meio de cultura sólido contendo antibiótico em diferentes concentrações, maiores que a CIM, desta forma podendo verificar a CIM da subpopulação em análise (99).

Na população bacteriana de um isolado pode conter uma subpopulação heterogênea, não sendo heterorresistente. Uma subpopulação com uma CIM maior do que a população original, mas não considerada resistente. Por exemplo, um isolado apresenta uma CIM $0,25 \mu\text{g/mL}$ para polimixina B, e fazendo a análise de heterorresistência encontra-se uma subpopulação com uma CIM $1 \mu\text{g/mL}$, então, esta não é heteroresistente e sim o isolado contém uma subpopulação heterogênea. Diferentemente de uma subpopulação heterorresistente, na qual, encontra-se subpopulações resistentes ao fármaco, sendo que a CIM original é sensível.

Em 2006, Li *et al.* (7) relataram pela primeira vez o fenômeno de heterorresistência utilizando colistina em isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*. Os autores analisaram o PAP de 16 isolados com CIMs entre $0,25$ a $2 \mu\text{g/mL}$ e detectaram a presença de subpopulações ($<0,1\%$ de inóculo de 10^8 a 10^9 UFC/ml) em 15 (93,8%) isolados, que foram capazes de crescer nas concentrações de 3 a $10 \mu\text{g/mL}$. As subpopulações não foram detectadas por qualquer outro teste de susceptibilidade antimicrobiana. O estudo de Hawley *et al.* (100) de 2008, encontraram uma porcentagem similar ao de Li *et al.*, no qual 100% dos isolados testados mostraram-se heterorresistentes.

Li *et al.* (7) verificaram que na maior parte dos isolados clínicos uma frequência de $0,0001$ a $0,000001\%$ de subpopulações cresceram na presença de $10 \mu\text{g/mL}$ de colistina. Este crescimento indica que as concentrações plasmáticas de

0,5 a 3,5 µg/mL, que são geralmente recomendadas podem ser incapazes de erradicar as subpopulações mais resistentes (101,102). O estudo de Li *et al.* (7) relata que os pacientes que foram expostos a colistina mostraram um aumento significativo do número de subpopulações resistentes observadas.

Hawley *et al.* (100) verificaram que a frequência de heteroresistência entre isolados de pacientes que tiveram tratamento anterior com colistina foram mais elevada do que a dos isolados não expostos a colistina (diferença estatisticamente significativa). Além disso, os estudos de Li *et al.* (7) e Hawley *et al.* (100) sugerem que, a fim de evitar as concentrações subótimas para tratamento com colistina, outras investigações farmacodinâmicas sobre a otimização da dosagem são necessárias e que a monoterapia com colistina deve ser evitada.

Diferente do estudo anterior de Li *et al.*, que analisou isolados de somente uma instituição, um estudo mais recente (98), em 2009, avaliou 30 isolados de *A. baumannii* multirresistentes coletados de diferentes lugares, como Austrália, Tailândia, Indonésia, Índia, Filipinas, China, Taiwan, Cingapura, América do Sul e Coréia. As CIMs para colistina foram de 0,5 e 2 mg/L, exceto um isolado que apresentou CIM de 128 mg/L. Sete (23%) isolados apresentaram heteroresistência para colistina, com o aparecimento de subpopulações em concentrações maiores de 2 mg/L.

Em 2009, Zavascki *et al.* (103) descreveram a evolução *in vivo*, de um perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, nos testes de disco-difusão e E-test, em um isolado de *A. baumannii*. O isolado passou de sensibilidade à resistência total aos carbapenêmicos, com um estágio intermediário de heteroresistência. O aparecimento de subpopulações na zona de inibição pelos testes descritos acima, foi caracterizada como heteroresistência. Este é o primeiro estudo a descrever este fenômeno *in vivo* e o segundo relato de heteroresistência com carbapenêmicos em *A. baumannii*. Semelhante ao estudo de Pournaras (88), em 2005, que descreveu heteroresistência com carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii*. Este estudo analisou 8 isolados e os CIMs iniciais para imipenem e meropenem foram entre 3-12 mg/L e 2-8 mg/L, respectivamente. Os CIMs das subpopulações foram maior que 32 mg/L.

Semelhante ao estudo anterior, Ikonomidis *et al.* observou subpopulações resistentes a meropenem e imipenem. Os CIMs da população inicial variou entre 0,25 a 4 mg/L, para ambos antibióticos. Os CIMs das subpopulações foi de 8 mg/L para imipenem e 32 mg/L para meropenem. As subpopulações resistentes para meropenem, de 11 isolados testados, exibiram resistência estável com CIMs que variaram de 16 a > 32 mg/L, confirmando com a análise de PFGE, o perfil da subpopulação foi idêntico da população total inicial (99).

No entanto, ainda não está definido o significado clínico e implicações terapêuticas destas subpopulações resistentes, por isso medidas de controle devem ser realizadas para prevenir a propagação e/ou surgimento destas subpopulações. Dados de pesquisa *in vitro* mais relevantes, experimentais e clínicos são necessários para uma melhor compreensão do fenômeno de heterorresistência.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que a polimixina B é a única opção terapêutica em muitas infecções causadas por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, uma melhor compreensão da prevalência do fenômeno de heterorresistência e da indução da resistência à polimixina B nesses isolados é de grande importância para minimizar as falhas terapêuticas. Assim, estudos que avaliem a presença desses fenômenos em isolados de *A. baumannii* envolvidos na etiologia de infecções hospitalares torna-se necessário, para melhor compreensão dos significados clínicos e implicações terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Avaliar a heterorresistência e resistência induzida à polimixina B em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

4.2 Objetivos secundários

1. Determinar a prevalência de heterorresistência à polimixina B em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;
2. Determinar a relação clonal entre os isolados de *A. baumannii* que obtiveram subpopulações heterogêneas;
3. Avaliar a estabilidade das subpopulações heterogêneas;
4. Avaliar a indução da resistência à polimixina B em isolados de *A. baumannii* sensíveis a polimixina;
5. Avaliar a estabilidade do fenótipo de resistência induzida à polimixina B.

5 REFERÊNCIAS

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**(3):538-82.
2. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. **Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.** *J Antimicrob Chemother.* 2007, **60**(6):1206-15.
3. Kwa AL, Tam VH, Falagas ME. **Polymyxins: a review of the current status including recent developments.** *Ann Acad Med Singapore* 2008, **37**(10):870-83.
4. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. **Polymyxins revisited.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**(3):449-65.
5. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL. **Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Int J Antimicrob Agents* 2011, **37**(3):187-93.
6. Fernández 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.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(8):3372-82.
7. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. **Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(9):2946-50.
8. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. **Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance?** *Clin Microbiol Infect.* 2008, **14**(2):101-4.

9. Murray CK, Hospenthal DR. ***Acinetobacter* infection in the ICU.** *Crit Care Clin* 2008, 24(2):237-48.
10. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. **Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens.** *Yonsei Med J* 2011, 52(6):879-91.
11. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. **Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment.** *Clin Microbiol Infect* 2002, 8(11):687-93
12. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. **Community-acquired *Acinetobacter* infections.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, 26(12):857-68.
13. Seifert H, Strate A, Pulverer G. **Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality.** *Medicine (Baltimore)* 1995, 74(6):340-9.
14. Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, Harris AD, Song X, Hebden J, Cosgrove SE, Anderson A, Carnell J, Jernigan DB, Kleinbaum DG, Perl TM, Standiford HC, Srinivasan A. **Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization.** *Emerg Infect Dis* 2007, 13(1):97-103.
15. Kwon KT, Oh WS, Song JH, Chang HH, Jung SI, Kim SW, Ryu SY, Heo ST, Jung DS, Rhee JY, Shin SY, Ko KS, Peck KR, Lee NY. **Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia.** *J Antimicrob Chemother* 2007, 59(3):525-30.
16. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. **Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein.** *J Bacteriol* 2008, 190(3):1036-44.

17. Paterson DL. **The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species.** *Clin Infect Dis* 2006, Sep 1;43 Suppl 2:S43-8.
18. Maragakis LL, Perl TM. ***Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options.** *Clin Infect Dis* 2008, 46(8):1254-63.
19. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S. **Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals.** *Res Microbiol* 2004, 155(2):105-12.
20. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, Amato G, Brisse S, Triassi M, Utili R, Zarrilli R. **Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone.** *J Clin Microbiol* 2010, 48(4):1223-30.
21. Nemeč A, Krízová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. **Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II.** *J Antimicrob Chemother* 2008, 62(3):484-9.
22. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. **Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*** *J Antimicrob Chemother* 2010, 65(2):233-8.
23. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. **Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections.** *J Hosp Infect* 1999, 42(3):201-4.
24. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. **Relevance of digestive tract colonization in the**

- epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1996, 23(2):329-34.
25. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. **Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(10):3471-84.
 26. Oncül O, Keskin O, Acar HV, Küçükardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, Top C, Nalbant S, Ozkan S, Emekdaş G, Cavuşlu S, Us MH, Pahsa A, Gökben M **Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake**. *J Hosp Infect* 2002, 51(1):47-51.
 27. Kennedy PJ, Haertsch P a, Maitz PK. **The Bali burn disaster: implications and lessons learned**. *J Burn Care Rehabil* 2005, 26(2):125-31.
 28. Tien HC, Battad A, Bryce EA, Fuller J, Mulvey M, Bernard K, Brisebois R, Doucet JJ, Rizoli SB, Fowler R, Simor A. **Multi-drug resistant *Acinetobacter* infections in critically injured Canadian forces soldiers**. *BMC Infect Dis* 2007, 14;7:95.
 29. Dortet L, Legrand P, Soussy C-J, Cattoir V. **Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens**. *J Clin Microbiol* 2006, 44(12):4471-8.
 30. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ, Jezek P, Vaneechoutte M. ***Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, 53(5):1563-7.
 31. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features**. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9(2):148-65.

32. Gaynes R, Edwards JR. **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.** *Clin Infect Dis* 2005, 41(6):848-54.
33. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.** *Clin Infect Dis* 2004, 39(3):309-17.
34. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, Ko WC. **Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007, 28(6):713-9.
35. Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Siegman-Igra Y, Schwaber MJ. **Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, 26(11):793-800.
36. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. **Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies.** *Crit Care* 2006, 10(2):R48.
37. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. **Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups.** *J Clin Microbiol* 2002, 40(2):685-6.
38. Fournier PE, Richet H. **The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities.** *Clin Infect Dis* 2006, 42(5):692-9.
39. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. **Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, 18(4):306-13.
40. Prates CG, Martins AF, Superti SV, Lopes FS, Ramos F, Cantarelli VV, Zavascki AP. **Risk factors for 30-day mortality in patients with**

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiol Infect* 2011, 139(3):411-8.
41. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. **High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil.** *Am J Infect Control* 2012, 40(2):108-12.
 42. Lee K, Kim MN, Kim JS, Hong HL, Kang JO, Shin JH, Park YJ, Yong D, Jeong SH, Chong Y; KONSAR Group. **Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009.** *Yonsei Med J* 2011, 52(5):793-802.
 43. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. **Colistin: new lessons on an old antibiotic.** *Clin Microbiol Infect* 2012, 18(1):18-29.
 44. Pankey GA. **Tigecycline.** *J Antimicrob Chemother* 2005, 56(3):470-80.
 45. Arnold TM, Forrest GN, Messmer KJ. **Polymyxin antibiotics for gram-negative infections.** *Am J Health Syst Pharm* 2007, 64(8):819-26.
 46. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. **Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8(1):71-93.
 47. Rasmussen BA, Bush K. **Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41(2):223-32.
 48. Alekshun MN, Levy SB. **Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.** *Cell* 2007, 128(6):1037-50.
 49. Queenan AM, Bush K. **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 2007, 20(3):440-58.

50. Bush K, Jacoby GA. **Updated functional classification of beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(3):969-76.
51. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. **High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(5):1749-51.
52. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. **Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital.** *J Clin Microbiol* 2003, 41(8):3542-7
53. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. **Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(3):1354-7.
54. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. **Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?** *Lancet Infect Dis* 2011, 11(5):381-93.
55. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. **Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?** *Clin Microbiol Rev* 2005, 18(2):306-25.
56. Hrabák J, Stolbová M, Studentová V, Fridrichová M, Chudáčková E, Zemlickova H. **NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011.** *Euro Surveill* 2012, 16;17(7).
57. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S, Deplano A, Huang TD, Hallin M, Denis O, Glupczynski Y. **Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium.** *J Antimicrob Chemother* 2012, 67(6):1552-3
58. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. **OXA-type carbapenemases.** *J Antimicrob Chemother* 2006, 57(3):373-83.

59. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. **ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii***. *Int J Antimicrob Agents* 1993, 2(2):81-7.
60. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. **Outbreak of carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil**. *J Clin Microbiol* 2003, 41(7):3403-6.
61. Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LCGD, Pereira MJF, Asensi MD. **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil**. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 34(1):25-8.
62. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL. **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil**. *Infection* 2009, 37(5):474-6.
63. Poirel L, Naas T, Nordmann P. **Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(1):24-38.
64. Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. **OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report**. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66(2):452-4.
65. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. **OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(1):202-8.
66. Gusatti C de S, Bertholdo LM, Otton LM, Marchetti DP, Ferreira AE, Corção G. **First occurrence of blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil**. *Braz J Microbiol* 2012, 43(1):243–6.

67. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. **OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53(12):5035-8.
68. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii***. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59(6):1210-5.
69. Sugawara E, Nikaido H. **OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii***. *J Bacteriol* 2012, 194(15):4089-96.
70. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. **Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases**. *J Clin Microbiol* 2000, 38(9):3299-305.
71. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City**. *Clin Infect Dis* 2003, 37(2):214-20.
72. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. **Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(3):947-53.
73. Ma Z, Cai S, Tong W, Ruan S, Wang H. **Role of the AdeABC efflux pump in carbapenems resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011, 31(8):1378-81.
74. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. **Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics**. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):257-67.

75. Gordon NC, Wareham DW. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance.** *Int J Antimicrob Agents* 2010, 35(3):219-26.
76. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. **The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis.** *FEMS Microbiol Rev* 2008, 32(2):234-58.
77. Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. **Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2003, 51(3):565-74.
78. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. **Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Indian J Med Res* 2011, 133:332-8.
79. Fishbain J, Peleg AY. **Treatment of *Acinetobacter* infections.** *Clin Infect Dis* 2010, 51(1):79-84.
80. Livermore DM. **Tigecycline: what is it, and where should it be used?** *J Antimicrob Chemother* 2005, 56(4):611-4.
81. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** *Clin Microbiol Rev* 2006, 19(3):512-30.
82. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. **Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*.** *J Clin Microbiol* 2005, 43(9):4328-35.

83. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. **The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp..** *Jpn J Infect Dis* 2009, 62(5):372-7.
84. Cooper JE, Feil EJ. **Multilocus sequence typing what is resolved?** *Trends Microbiol* 2004, 12(8):373-7.
85. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. **Polymyxins revisited.** *Clin Microbiol Rev* 2008, 21(3):449-65.
86. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. **Polymyxin and related peptide antibiotics.** *Annu Rev Biochem* 1977, 46:723-63.
87. Moyer JH, Mills LC, Yow EM. **Toxicity of polymyxin B. I. Animal studies with particular reference to evaluation of renal function.** *AMA Arch Intern Med* 1953, 92(2):238-47.
88. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. **Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2005, 55(6):1055-6.
89. Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodrigues E, Sauaia N, Boulos M. **An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17(6):366-8.
90. Fass RJ, Barnishan J, Ayers LW. **Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital.** *J Antimicrob Chemother* 1995, 36(2):343-53.
91. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. **Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50(6):1953-8.

92. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. **Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria.** *Int J Antimicrob Agents* 2005, 25(1):11-25.
93. Vaara M. **Polymyxins and their novel derivatives.** *Curr Opin Microbiol* 2010, 13(5):574-81.
94. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. **Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.** *J Antimicrob Chemother* 2007, 60(6):1206-15.
95. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. **Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options.** *Drug Resist Updat* 2010, 13(4-5):132-8.
96. 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.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(8):3743-51.
97. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. **Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(12):4971-7.
98. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, Yu HH, Nation RL, Li J. **Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme.** *J Infect* 2009, 58(2):138-44.
99. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. **Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*.** *J Clin Microbiol* 2009, 47(12):4055-9.

100. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. **Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52(1):351-2.
101. Giamarellou H, Poulakou G. **Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options?** *Drugs* 2009, 69(14):1879-901.
102. Falagas ME, Kasiakou SK. **Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections.** *Clin Infect Dis* 2005, 40(9):1333-41.
103. Superti SV, Martins DDS, Caierão J, Soares FDS, Prochnow T, Zavascki AP. **Indications of carbapenem resistance evolution through heteroresistance as an intermediate stage in *Acinetobacter baumannii* after carbapenem administration.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009, 51(2):111-3.

6 ARTIGO

Submetido para a revista *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*.

Article title: Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates.

Manuscript ID: 2038931620938274

Authors: Juliana Barin, Andreza F. Martins, Bianca Heineck, Alexandre P. Zavascki.

Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates

Juliana Barin¹

Email: julianabarin@gmail.com

Andreza Francisco Martins²

Email: amartins20@bol.com.br

Bianca Lucia Heineck³

Email: bianca.heineck@gmail.com

Afonso Luis Barth⁴

Email: albarth@hcpa.ufrgs.br

Alexandre Prehn Zavascki⁵

* Corresponding author

Email: apzavascki@gmail.com

¹ Post-Graduate Medical Sciences Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

² Biomedicine School, IPA, Porto Alegre, Brazil;

³ School of Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴ Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre , Porto Alegre, Brazil;

⁵ Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

* Corresponding Author: Alexandre Prehn Zavascki. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil. Phone/fax: +55 (51) 33598152, e-mail: azavascki@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background: Resistance rates to polymyxin B in surveillance studies have been very 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 its stability in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) clinical isolates.

Methods: CRAB isolates were recovered from hospitalized patients at three Brazilian hospitals. Hetero-resistance was determined by population analysis profile (PAP). Adaptive resistance was evaluated after serial daily passages of isolates in Luria-Bertani broth containing increasing polymyxin B concentrations. MICs of polymyxin B of colonies growing at the highest polymyxin B concentration were further determined after daily sub-cultured in antibiotic-free medium and after storage at -80°C, in some selected isolates.

Results: Eighty OXA-23-producing CRAB isolates were typed resulting in 15 distinct clones. Twenty-nine randomly selected isolates (at least one from each clone) were selected for hetero- resistance evaluation: 26 (90%) presented growth of subpopulations with higher polymyxin B MIC than the original one in PAP. No isolated has grown at polymyxin B concentrations higher than 2 mg/L. Polymyxin B MICs of subpopulations remained higher than the original population after daily passages on antibiotic-free medium but returned to the same or similar levels after storage. Twenty-two of the 29 isolates (at least one from each clone) were evaluated for adaptive resistance: 12 (55%) presented growth in plates containing 64 mg/L of

polymyxin B. Polymyxin B MICs decreased after daily passages on antibiotic-free medium and returned to the same levels after storage.

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

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; polymyxins; polymyxin B; colistin; hetero-resistance; adaptive resistance; multidrug-resistance; carbapenemase.

Background

The increasing worldwide prevalence of multi-drug resistant, *Acinetobacter baumannii*, a major nosocomial pathogen, particularly carbapenem-resistant strains, is of great concern, since treatment becomes restricted to very few options [1]. Polymyxins, both B and E (colistin), are “old” polypeptide antibiotics that re-emerged in clinical practice as the last resort therapy against multidrug-resistant Gram-negative bacteria; many, including *A. baumannii*, are only susceptible to these drugs [2]. Although resistance rates to polymyxins in surveillance studies fortunately remain very low [3], two relatively poorly understood resistance phenotypes, hetero- and adaptive resistance, have been reported in these drugs [4,5].

The term hetero-resistance refers to a phenotype characterized by the presence of different (drug-resistant and –susceptible) populations in a single clinical specimen or isolate [6], while adaptive resistance describes an autoregulated phenomenon characterised by rapid induction of resistance in the presence of drug and reversal to the susceptible phenotype in its absence [7].

Hetero-resistance has been recently described for colistin in some carbapenem-resistant *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolates [8-10], and other studies have demonstrated the presence of adaptive resistance to polymyxins, mainly in *P. aeruginosa* [7]. No study so far has neither investigated the presence of hetero-resistance for polymyxin B, the frequency of adaptive resistance in carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) isolates, nor assessed the presence of these distinct phenomena in the same isolates. The aim of this study was to assess the occurrence of these phenomena and evaluate its stability in CRAB clinical isolates.

Methods

Bacterial Strains

CRAB isolates were selected from a total of 132 *Acinetobacter* spp. isolates (one isolate by patient) consecutively recovered from patients admitted to three tertiary-care hospitals from Porto Alegre, Brazil, from March to December 2011. Isolates were identified by Vitek 2 system. The following carbapenemase-encoding genes were examined by multiplex PCR: *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143} genes [11]. *A. baumannii* specie was confirmed by the presence of the intrinsic *bla*_{OXA-51} gene [12].

MICs for polymyxin B, imipenem and meropenem were determined by broth microdilution and interpreted according to CLSI guidelines [13]. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was included as quality control in all tests.

CRAB isolates were submitted to molecular typing by *Apal* DNA macrorestriction followed by PFGE [14]. Results were interpreted using a dendrogram constructed using the band-based Dice coefficient method, and, for the purpose of this study, isolates with >90% were considered a clone.

Hetero-resistance

Hetero-resistance in selected CRAB isolates was determined by population analysis profile (PAP). Briefly, a 20µL aliquot from a 24h culture serially diluted in saline with approximately 10⁸ bacterial CFU (0.5 McFarland standard) was spread on Mueller-Hinton agar plates containing 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 6 mg/L of polymyxin B. Colonies were counted after 48h of incubation at 35°C. The limit of counting was 20 CFU/ml.

The frequency of hetero-resistant subpopulations at the highest drug concentration was calculated by dividing the number of colonies grown on antibiotic-containing plates by the colony counts from the same bacterial inoculum plated onto antibiotic-free plates [9]. MICs of polymyxin B of these subpopulations growing at the highest polymyxin B concentration were determined after daily sub-cultured in antibiotic-free medium for 4 days and after 75 days storage at -80°C, in some selected isolates.

Adaptive Resistance

Isolates were submitted to serial daily passages in Luria-Bertani (LB) broth containing increasing polymyxin B concentrations of 0.25 to 64 mg/L for a total of nine days. MICs of polymyxin B of colonies growing at the highest polymyxin B concentration were also determined after daily subculture in antibiotic-free medium for 3 days and after 60 days storage at -80°C, in some isolates.

Results

Of the 132 *Acinetobacter* spp., 124 were confirmed as *A. baumannii* by the presence of *bla*_{OXA-51} gene, and 89 (71.7%) of these were CRAB isolates. All CRAB isolates were positive for *bla*_{OXA-23} and no product of amplification was detected for the other carbapenemase-encoding genes. Of these, 80 were typed, resulting in 15 distinct clones. MIC₅₀ for both imipenem and meropenem were 64 µg/mL and 32 µg/mL and MIC₉₀ were 128 µg/mL and 64 µg/mL, respectively. MIC of polymyxin B ranged from ≤0.125 µg/mL to ≥64 µg/mL. Twenty-nine randomly selected isolates (at least one from each clone) were selected for hetero-resistance evaluation.

PAP revealed the growth of subpopulation with higher polymyxin B MIC than the original population in 26 (90%) of 29 isolates, including at least one isolate representative of each clone (table 1). No isolated has grown at polymyxin B concentrations higher than 2 $\mu\text{g/mL}$. The proportions of higher MIC subpopulations ranged from 2.5×10^{-7} to 6.2×10^{-4} . MICs of polymyxin B of the 26 “higher MIC” subpopulations remained higher than the original population MIC after daily passages on polymyxin B-free medium (Table 1). After storage, MIC for polymyxin B among 17 selected subpopulations with higher MIC returned to levels similar to the original population, with most presenting exactly the same MIC of the original population.

Twenty-two of the 29 isolate (at least one from each clone) were evaluated for adaptive resistance. In twelve isolates, growth was observed in plates containing 64 $\mu\text{g/mL}$ of polymyxin B (Table 2). After daily passages on polymyxin B-free medium for 3 days the MIC of isolates growing at 64 $\mu\text{g/mL}$ remained the same for two isolates and decreased 1- to 2-fold dilutions for the other ten (Table 2). Polymyxin B MICs after 60 day storage (performed in four isolates) were exactly the same of the MIC of baseline.

Discussion

Our study for the first time investigated the presence of hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in unrelated OXA-23-producing CRAB isolates. Additionally, the stability of these phenomena was evaluated in two distinct conditions. Since the susceptibility breakpoint for polymyxin B according to CLSI is 2 $\mu\text{g/mL}$ [13], real hetero-resistance for polymyxin B was not found in any isolate,

differently from previous studies with colistin [9,15,16]. However, the presence of “higher MIC” subpopulations, within the susceptibility range, was detected in 90% of tested isolates, including at least one isolate representative of each of the 15 clones. These “higher MIC” subpopulations presented MICs 2- to at least 4-fold dilutions higher than the original population.

The presence of adaptive resistance to polymyxin B could be shown in 55% of 22 tested isolates (present in 7 of 15 clones), all demonstrating high-level resistance to polymyxin B (MIC = 64 μ g/mL). Although some molecular mechanisms of adaptive resistance to polymyxins, such as mutations in *pmrCAB* and *lpxA* gene in *A. baumannii* [17, 18] and PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB and recently ParR-ParS in *P. aeruginosa* [19], have been characterized, its presence has not been systematically evaluated. Thus, our study further suggests that adaptive resistance might be most common than possibly expected, at least in CRAB, since approximately half of tested clones showed such adaptive phenotype. Indeed, the frequency would be even higher since the agar plate with the lowest polymyxin B concentration had 0.25 μ g/mL of the drug, and although seven isolates with MIC \leq 0.125 μ g/mL still have growth on these plates, three have not, and it could have occurred if initial plates were prepared with lower concentrations; This was not done owing to technical limitations.

The present study also showed that the MIC of the “higher MIC” subpopulations remained stable after 4-days into antimicrobial-free medium, but returns to the MIC of the original population after storage at -80°C, suggesting that it might involve some molecular basis also associated with an unstable phenotype. As expected, since without the drug-sustaining effect the adaptive resistance is unstable, the MICs of resistant isolates selected in the adaptive resistance experiment decreased 1- to 2-

fold dilutions after serial passage into antimicrobial-free medium and all tested isolates returns to the baseline level after the storage at -80°C.

Only one isolate that has presented adaptive resistance has not presented “higher MIC” subpopulation in PAP. It belongs to the clone A, which has other three isolates tested in both experiments, all showing the presence of both phenomena. It is also interesting that these latter three isolates were identical by typing while the former showed 92% of similarity with these latter ones (data not shown). Another isolate has neither presented “higher MIC” subpopulation nor adaptive resistance and belongs to a clone with two representative isolates among the 80 CRAB typed in this study.

Unfortunately, we were not able to determine the molecular determinants of these phenotypes in this study. We also could not determine if the absence of real hetero-resistance (i.e. presence of subpopulations with MICs higher than the susceptibility breakpoint) was a specific characteristic of polymyxin B, and would occur with colistin, or “higher MIC” subpopulations within the susceptibility range was only detected, instead of subpopulations with “resistance MICs” because the baseline MIC of half of the tested isolates were very low ($\leq 0.125 \mu\text{g/mL}$).

In summary, our study showed that the presence of “higher MIC” subpopulations in CRAB isolates was extremely common. Additionally, high-level adaptive resistance was also very frequent. The clinical significance of each phenomenon should be further investigated, since both may potentially affect the outcomes of patients on therapy with polymyxins.

Competing interests

A. P. Z. has received consultancy fees from Pfizer, Eurofarma and Forest Laboratories. All other authors: none to declare.

Authors' contributions

JB was responsible for performance of the experiments, data interpretation and drafting the manuscript; BLH performed the experiments and contributed to manuscript draft; AFM and ALB contributed in the experiments, data interpretation and manuscript draft; and APZ conceived the study, contributed in data interpretation, drafting and reviewing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (12-0010) and 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. Vila J, Pachón J: **Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update.** *Expert Opin Pharmacother* 2012; **13**:2319-36.
2. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL: **Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.** *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1206-15.
3. 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* 2011; **66**:2070-4.
4. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK: **Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options.** *Drug Resist Updat* 2010; **13**:132-8.
5. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N: **Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies.** *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**:1607-15.
6. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaïou DK: **Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance?** *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**:101-4.
7. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL: **Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**:187-93.

8. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A: **Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems.** *J Med Microbiol* 2007; **56**:66–70.
9. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, Yu HH, Nation RL, Li J: **Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme.** *J Infect* 2009; **58**:138-44.
10. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D: **Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*.** *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**:946-7.
11. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H: **Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.** *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**:305-14.
12. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL: **Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*_{OXA-51-like} Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species.** *J Clin Microbiol* 2006; **44**:2974-76.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement.* CLSI document M100-S21. Wayne, PA, USA, 2011.
14. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L: **Standardization and interlaboratory**

- reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:4328-35.
15. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L: **Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:2946–50.
16. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH: **Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy**. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:351-2.
17. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA: **Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system**. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:3628-34.
18. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD: **Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:4971-7.
19. Fernández 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**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:3372-82.

Table 1. Results of population analysis profile (PAP) of selected carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates

Strain	PFGE group	Broth MIC (mg/L)	Highest concentration where growth occurred in population analysis (mg/L)	Frequency of appearance of subpopulations (PAP)	MIC after 4 days daily passages in drug-free medium (mg/L)	MIC after 75 days storage (mg/L)
1	A	≤ 0.125	1	6.6 x 10 ⁻⁵	1	≤ 0.125
2	A	≤ 0.125	2	6 x 10 ⁻⁵	2	≤ 0.125
3	A	0.25	NG	NA	NA	NA
4	A	≤ 0.125	1	1 x 10 ⁻⁷	1	NP
5	A	0.25	1	5 x 10 ⁻⁵	1	NP
6	A	0.25	1	1.5 x 10 ⁻⁶	1	NP
7	B	≤ 0.125	0.5	5 x 10 ⁻⁴	0.5	≤ 0.125
8	B	0.25	1	2.5 x 10 ⁻⁷	1	0.25
9	B	≤ 0.125	0.5	1 x 10 ⁻⁶	0.5	NP
10	C	≤ 0.125	1	1.2 x 10 ⁻⁵	1	≤ 0.125
11	C	1	1	NA	1	1
12	C	≤ 0.125	1	7.1 x 10 ⁻⁵	1	NP
13	D	≤ 0.125	1	1.3 x 10 ⁻⁶	1	NP
14	D	≤ 0.125	1	3.3 x 10 ⁻⁶	1	NP
15	E	0.25	1	1 x 10 ⁻⁶	1	NP
16	F	0.5	2	8.3 x 10 ⁻⁵	2	1

Table 1. Continued

Strain	PFGE group	Broth MIC (mg/L)	Highest concentration where growth occurred in population analysis (mg/L)	Frequency of appearance of subpopulations (PAP)	MIC after 4 days daily passages in drug-free medium (mg/L)	MIC after 75 days storage (mg/L)
17	F	≤ 0.125	1	1×10^{-6}	1	≤ 0.125
18	G	0.25	1	7.5×10^{-5}	1	0.25
19	H	0.25	1	3.3×10^{-4}	1	0.25
20	I	0.25	2	3.3×10^{-5}	2	1
21	I	0.5	1	3×10^{-6}	1	1
22	J	0.25	1	1.4×10^{-4}	1	0.25
23	K	0.25	NG	NA	NA	NA
24	L	≤ 0.125	0.5	1.5×10^{-6}	0.5	≤ 0.125
25	L	≤ 0.125	1	4×10^{-4}	1	NP
26	M	≤ 0.125	1	6.2×10^{-4}	1	≤ 0.125
27	N	0.5	2	6.6×10^{-5}	2	1
28	N	≤ 0.125	0.5	1.5×10^{-5}	0.5	NP
29	O	≤ 0.125	1	5×10^{-5}	0.5	0.5

PAPs, population analysis profiles; NA, not applicable; NG, no growth; NP, not performed.

Table 2. Results of adaptive resistant experiments of selected carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates

Strain	PFGE group	Broth MIC (mg/L)	Presence of higher polymyxin B MIC subpopulations	Highest concentration of polymyxin B where growth was observed (mg/L)	MIC after 3 days daily passages in drug-free medium (mg/L)	MIC after 60 days storage (mg/L)
2	A	≤ 0.125	2	64	32	NP
3	A	0.25	NA	64	16	NP
5	A	0.25	1	NG	NA	NA
6	A	1	1	64	16	NP
7	B	≤ 0.125	0.5	64	16	NP
8	B	0.25	1	64	16	NP
9	B	≤ 0.125	0.5	64	16	NP
10	C	≤ 0.125	1	64	32	≤ 0.125
12	C	≤ 0.125	1	64	16	NP
14	D	≤ 0.125	1	NG	NA	NA
15	E	0.25	1	NG	NA	NA
16	F	0.5	2	NG	NA	NA
17	F	≤ 0.125	1	NG	NA	NA
18	G	0.25	1	64	≥ 64	NP
19	H	0.25	1	NG	NA	NA
20	I	0.25	2	NG	NA	NA

Table 2. Continued

Strain	PFGE group	Broth MIC (mg/L)	Presence of higher polymyxin B MIC subpopulations	Highest concentration of polymyxin B where growth was observed (mg/L)	MIC after 3 days daily passages in drug-free medium (mg/L)	MIC after 60 days storage (mg/L)
22	J	0.25	1	64	16	0.25
23	K	0.25	NA	NG	NA	NA
24	L	≤ 0.125	0.5	64	16	≤ 0.125
26	M	≤ 0.125	1	64	≥ 64	≤ 0.125
27	N	0.5	2	NG	NA	NA
29	O	≤ 0.125	1	NG	NA	NA

NA, not applicable; NG, no growth; NP, not performed.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo não foi detectado a presença de subpopulações de isolados de *A. baumannii* heterorresistentes frente a polimixina B;
- Subpopulações de isolados de *A. baumannii* com uma CIM maior (de 2 a 4 diluições maiores) que a original foi alta neste estudo;
- O estudo mostra que estabilidade das subpopulações com CIMs maiores permaneceram estáveis após 4 dias em meio livre de antibiótico, mas retornaram a CIM original após o armazenamento a -80°C;
- A resistência adaptativa foi relatada em mais da metade dos isolados testados, mostrando um fenômeno comum neste estudo. Todos os isolados apresentaram alto nível de resistência à polimixina B (CIMs de 64 µg/mL);
- Somente um isolado apresentou resistência adaptativa e não apresentou subpopulação com uma CIM maior;
- A resistência adaptativa mostrou-se instável, diminuindo, entre 1 e 2 diluições, após o cultivo, em dias consecutivos, em meio livre de antibiótico, e voltando para a CIM original após o armazenamento a -80°C;
- Os resultados deste estudo nos permitem sugerir que ambos os fenômenos podem envolver mecanismos moleculares associados, tanto ao desenvolvimento de subpopulações como a resistência induzida. Assim, estudos moleculares devem ser realizados para melhor compreensão desses fenótipos.