

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**DJULI MILENE HERMES**

**Avaliação da heteroresistência à polimixina B em isolados de *Pseudomonas aeruginosa***

Porto Alegre

2013

**DJULI MILENE HERMES**

**Avaliação da heteroresistência à polimixina B em isolados de *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Porto Alegre

2013

## CIP - Catalogação na Publicação

Hermes, Djuli Milene

Avaliação da heteroresistência à polimixina B em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* / Djuli Milene Hermes. -- 2013.

52 f.

Orientadora: Afonso Luis Barth.

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. Heteroresistência. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Polimixina B. I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Título.

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

## DEDICATÓRIA

Para aquela que, em seu sorriso inspirava-me a ir sempre mais longe. Pela confiança depositada, este trabalho a minha mãe, Marsoé Lisane Francesquet Hermes, dedico com muito amor.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Afonso Luis Barth e co-orientadora Andreza Francisco Martins, pelos ensinamentos e confiança, agradeço pela dedicação, discussões e alegrias.

A banca que gentilmente aceitou participar da construção e melhoria deste trabalho, Dr. Alexandre Prehn Zavascki, Dr. Leandro Réus e Dr. Valério Aquino.

Aos meus pais, Rui Luis Hermes, Marsoé Lisane Francesquet Hermes e a minha Vó, Zilda Lazzari Francesquet.

Com muito amor, agradeço ao Tiago Bertoletti Carpenedo, pelo apoio incondicional, pelo “vá sempre em frente”, e “da o teu jeito”, frases estas que estimularam-me constantemente.

Para aqueles poucos amigos, porém verdadeiros, agradeço com carinho a compreensão, apoio e força à Martiele Maíra Beskow, Jackeline Ramos Martins, Ana Paula Batista da Silva, Tobias Falcão, Maria Helena Lima, Kerli Moresco e Rita Tolotti.

A família Carpenedo, os maiores positivistas da história (da minha vida), Natalino Carpenedo, Lídia Bertoletti Carpenedo, Camila Bertoletti Carpenedo e Roger Delavi.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Centro de Pesquisa Experimental, aos colegas de pesquisa, especialmente agradeço à Caroline Pormann, Aline Borges Teixeira, Bárbara Neto, Vanessa Bley Ribeiro, Luciana Nunes, Fábio Knapp, Larissa Lutz e aos demais colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas e Autoimunes do HCPA, Unidade de Microbiologia, Biologia Molecular e de Esterilização do HCPA.

*“Try not to become a man of success,  
but rather a man of value.”*

**Albert Einstein**

## RESUMO

Opções terapêuticas para tratar infecções por *Pseudomonas aeruginosa* são limitadas por seus diversos mecanismos de resistência, que podem ou não ser detectados no laboratório clínico. Um fenótipo observado na rotina laboratorial é o surgimento de subpopulações resistentes a partir de uma população sensível aos antimicrobianos – heteroresistência. Em *P. aeruginosa* esse fenômeno já foi investigado para carbapenêmicos, porém, em relação à polimixina B, não há dados literários. Objetivamos avaliar a heteroresistência à polimixina B em dois grupos de *P. aeruginosa*, um sensível e outro resistente aos carbapenêmicos. Cento e vinte e quatro isolados de *P. aeruginosa* foram obtidos, aleatoriamente, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 2011. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, disco difusão e microdiluição em caldo – CIM (determinação da concentração inibitória mínima) para polimixina B, foi realizada conforme o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) 2011. Isolados resistentes aos carbapenêmicos foram avaliados para CIM dos carbapenêmicos e cefalosporinas, e para pesquisa fenotípica e genotípica de metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L). Um total de 24/124 isolados foi separado em dois grupos, um sensível (grupo S) e outro resistente (grupo R) aos carbapenêmicos (imipenem e/ou meropenem) para investigação da heteroresistência a polimixina B. Realizou-se ensaio de heteroresistência em duplicata através de diluições seriadas, partindo de uma suspensão de 0,5 de MacFarland e inoculadas em Agar Mueller Hinton com concentrações crescentes de polimixina B (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8  $\mu$ g/mL). Após 5 dias de passagem em meio sem antibiótico, foi determinada a CIM dos isolados que cresceram na concentração mais alta de polimixina B. O perfil de análise populacional (PAP) foi definido pela razão do número de unidades formadoras de colônia (UFC) da placa com maior concentração de polimixina B onde houve crescimento bacteriano, pelo número de UFC da placa sem antibiótico. Foram consideradas heteroresistentes amostras que apresentaram subpopulações com crescimento em concentração de polimixina B  $\geq$  2  $\mu$ g/mL. Amostras com subpopulações com crescimento em concentração de polimixina B superiores duas vezes ao CIM original, mas  $<$  2  $\mu$ g/mL, foram classificadas como heterogêneas. O resultado do disco difusão indicou heterogeneidade de

suscetibilidade, sendo que gentamicina e imipenem foram os antibióticos com maior percentual de resistência e aztreonam e ciprofloxacino apresentaram os maiores perfis de sensibilidade. Todos os isolados foram sensíveis à polimixina B, com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 1µg/mL e 2µg/mL, respectivamente. Trinta e sete isolados (30%; 37/124) apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Quatro amostras foram positivas para MβL no teste fenotípico, sendo que o gene *bla<sub>IMP</sub>* foi identificado nestas amostras. O grupo S não apresentou subpopulação heteroresistente, porém 3 isolados apresentaram subpopulação heterogênea. A frequência do PAP no grupo S variou entre  $2,1 \times 10^{-4}$  a  $4,0 \times 10^{-7}$ . O grupo R apresentou uma amostra heteroresistente e 6 isolados apresentaram subpopulação heterogênea, a frequência do PAP variou entre  $2,6 \times 10^{-4}$  a  $2,0 \times 10^{-7}$ . Os resultados deste estudo indicam baixa ocorrência de heteroresistência à polimixina B em amostras de *P. aeruginosa* tanto resistentes quanto sensíveis aos carbapenêmicos. No entanto, diversas amostras apresentaram subpopulações heterogêneas (CIM aumentada para a polimixina B), o que poderia explicar eventuais falhas terapêuticas durante o tratamento.

Palavras-chave: Heteroresistência, Polimixina B, *Pseudomonas aeruginosa*



## ABSTRACT

Therapeutic options to treat infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* are limited because of their different resistance mechanisms that can be or don't be detected in the clinical laboratory. A phenotype that has been observed in our laboratory is the emergence of resistant subpopulations from a population sensitive to antibiotics - a phenomenon named heteroresistance. In *P. aeruginosa* this phenomenon has been investigated for carbapenems, however, in relation to the polymyxin B no data in the literature. We investigate the heteroresistance and polymyxin B into two groups *P. aeruginosa*, one sensitive and second resistant to carbapenems. One hundred twenty-four strains of *P. aeruginosa* were obtained randomly at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre in 2011. The Antimicrobial Susceptibility Testing (Disk-difusion and the microdilution broth, with determination of minimum inhibitory concentration (MIC) for polymyxin B, was performed according the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011. Isolates resistant to carbapenems were evaluated for MIC of carbapenems and cephalosporins, also for phenotypic and genotypic metallo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L). A total of 24/124 strains were separated in two groups, one sensitive (S group) and other resistant (R group) to carbapenems (imipenem and / or meropenem) for investigation of heteroresistance polymyxin B. The assay was performed in duplicate heteroresistance through serial dilutions, starting from a 0.5 MacFarland suspension and inoculated into Mueller Hinton Agar with increasing concentrations of polymyxin B (0; 0,5; 1; 2; 4 e 8 $\mu$ g/mL). After 5 days of passage in medium without antibiotics, was determined the MIC of the isolates that grew at the highest concentration of polymyxin B. The population analysis profile (PAP) was defined as the ratio of the number of colony forming units (CFU) on the card with the highest concentration of polymyxin B in which bacterial growth, the number of CFU plate without antibiotic. We considered heteroresistant samples that showed subpopulations with growth in concentration of polymyxin B  $\geq$  2 mg / mL. Samples with subpopulations growing at higher concentration of polymyxin B twice CIM original, but <2 mg / mL were classified as heterogeneous. The result of AST indicated heterogeneity of susceptibility, and gentamicin and imipenem were the

highest percentage with antibiotic resistance and aztreonam and norfloxacin showed the highest sensitivity profiles. All isolates were susceptible to polymyxin B, with CIM<sub>50</sub> and CIM<sub>90</sub> of 1µg/mL and 2µg/mL, respectively. Thirty-seven isolates (30%; 37/124) were resistant to carbapenems. Four samples were positive for the phenotypic test to MβL and the *bla*<sub>IMP</sub> gene was indentificated in this samples. The S group showed no subpopulation heteroresistente, but 3 isolates showed heterogeneous subpopulation. The frequency of PAP in group S varied between 2,0x10<sup>-4</sup> to 4,0x10<sup>-7</sup>. The group R provided a sample heteroresistant and 6 isolates showed heterogeneous subpopulation, the frequency of PAP varied between 2,6x10<sup>-4</sup> a 2,0x10<sup>-7</sup>. The results of this study indicate a low occurrence of heteroresistance to polymyxin B in samples of *P. aeruginosa* so resistant assensitive to carbapenems. However, several samples showed heterogeneous subpopulations (MIC increased to polymyxin B) which could explain possible treatment failure during treatment.

Keywords: heteroresistance, Polymyxin B, *Pseudomonas aeruginosa*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da Polimixina B.....	23
------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Metalo- $\beta$ -lactamases já descritas na literatura conforme país de descoberta, ano de isolamento e microrganismo de origem.....	21
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Australian metallo-beta-lactamase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	Gene da metallo-beta-lactamase IMP
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Gene da metallo-beta-lactamase SPM
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Gene da metallo-beta-lactamase VIM
BNG-NF	Bacilos Gram-Negativos Não Fermentadores
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DIM	Dutch Imipenemase
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HRM	<i>Hight Resolution Melting</i>
IMP	Imipenemase
KHM	Kyorin Health Science metallo-beta-lactamase
MBL	Metallo-beta-lactamase
MDR	Multirresistente
NDM	Nova Delhi Metallo-beta-lactamase
PAP	Perfil de Análise Populacional
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
SPM	São Paulo Metallo-beta-lactamase
SIM	Seul Imipenemase
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
TSI	Tripe Sugar Iron
TMB-1	Tripoli metallo-beta-lactamase

UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
2.2 Importância Clínica.....	18
2.3 Mecanismos de Resistência.....	19
2.4 Polimixina B.....	22
2.5 Heteroresistência .....	24
3 OBJETIVOS .....	26
3.1 Objetivo primário .....	26
3.2 Objetivos secundários .....	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
5 ARTIGO EM INGLÊS .....	36
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo oportunista, frequentemente isolado de infecções nosocomiais. É um importante patógeno em pacientes hospitalizados, devido, entre outros aspectos, à presença de múltiplos mecanismos de resistência (Lopes, 2009).

Os fármacos utilizados para tratar infecções graves por *P. aeruginosa* são os carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Porém, devido ao intenso uso destes antimicrobianos, surgiram as *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. A taxa de resistência de *P. aeruginosa* tem aumentado em todo o mundo, principalmente na América Latina (Sader *et al.*, 2004). No Brasil, a região Sul é a que possui a maior porcentagem, sendo que mais de 80% de resistência ao imipenem já foi relatada (Neves, *et al.*, 2011).

Desta forma a polimixina B é uma das principais opções no tratamento de infecções por cepas multiresistentes de *P. aeruginosa*. (Landam *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005). As polimixinas atuam na desestabilização da membrana plasmática, ocasionando a saída dos constituintes internos da célula, levando à lise. Este mecanismo de ação faz com que a polimixinas sejam consideradas dose dependentes, ou seja, a desestabilização da membrana plasmática é proporcional a dose de polimixina ministrada. Este fato previne à resistência cruzada com outros antimicrobianos, mas não exclui a possibilidade de ocorrer falhas terapêuticas (Barnett, Bushby e Wilkinson, 1964; Horton e Pankey 1982; Zavascki *et al.*, 2007)

A heteroresistência é um fenômeno que se caracteriza pela presença de uma subpopulação resistente dentro de uma população bacteriana sensível a um antimicrobiano. Subpopulações resistentes em uma população microbiana sensível não são investigadas na rotina laboratorial apesar de alguns testes de susceptibilidade poderem prever o fenômeno, como o disco difusão e o Etest<sup>®</sup> ou MICE (Biomérieux) (Lo-Ten-Foe *et al.*, 2007, Pounaras *et al.*, 2007).

Não há ainda um entendimento completo sobre o significado clínico de isolados heteroresistentes nem do seu impacto clínico, no entanto a avaliação de



heteroresistência é importante para predizer a efetividade clínica da terapia antimicrobiana, e também para a detecção de tendências de resistência de isolados de *P. aeruginosa* (Falagas *et al.*, 2008).

Poucos relatos são descritos com investigação de heteroresistência em *P. aeruginosa*, mas os carbapenêmicos já foram investigados e os resultados demonstraram crescimentos de subpopulações resistentes (Pounaras *et al.*, 2007). Entretanto, o fenômeno da heteroresistência à polimixina B em *P. aeruginosa* ainda não foi descrito na literatura (Pounaras *et al.*, 2007; Martínez, 2008; Ikonomidis *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 *Pseudomonas aeruginosa***

Caracterizada como bacilo Gram-negativo não fermentador (BGN-NF), *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria pertencente à família *Pseudomonadaceae*, não esporulante, que possui motilidade flagelar e uma cadeia respiratória com terminações ricas em oxidases e enzimas que produzem a degradação do nitrato, sendo desta forma, considerada um microrganismo aeróbico estrito e resistente às condições extremas de adaptação (Arai, 2011). Possui ampla faixa de crescimento, com otimização entre 30°C a 40°C, não excludente crescimento acima ou abaixo destas temperaturas, sendo 42°C uma característica especial de crescimento que a diferencia de outros microorganismos. (Murray *et al.*, 1999; Tortora, Funke e Case, 2005).

Sua morfologia colonial pode diferir, com crescimento de colônias com tamanho médio e pequeno, bordas irregulares, planas, com coloração metálica (Murray *et al.*, 1999; Tortora, Funke e Case, 2005). Produz pigmentos que auxiliam

na sua identificação: piocianina (mais comum), pioverdina, piorrubina e piomelanina. A coloração azulada da piocianina está presente na maioria dos isolados, pioverdina (amarelo-esverdeada) é encontrada em isolados fluorescentes de *P. aeruginosa* e a piorrubina, com coloração vermelha e a piomelanina com cor preta são incomuns – presente apenas em 2% das amostras (Barth e Pitt, 1998; Tortora, Funke e Case, 2005).

De acordo com suas características bioquímicas, *P. aeruginosa* possui metabolismo oxidativo, diferente de outras bactérias que utilizam os carboidratos pela via fermentativa. Os principais testes laboratoriais de identificação são: o TSI (*Triple Sugar Iron*), a oxidase, catalase, nitrito, citrato, motilidade; sendo também produtora de arginina dehidrolase e ornitina descarboxilase (Tortora, Funke e Case, 2005).

É considerado um patógeno oportunista, nutricionalmente versátil - utiliza fontes simples e/ou complexas de carbono e nitrogênio, possui fácil disseminação, capacidade de resistir a umidade e também a dessecação. Possui fatores de virulência naturais, como os lipopolissacarídeos, que além de terem ação de endotoxina, protegem a célula contra a fagocitose, quimiotaxia e, opsonização. A produção de alginato é um dos principais fatores de virulência mas praticamente exclusivo de amostras obtidas de pacientes com fibrose cística. Também possuem diversas enzimas, como a exotoxina A, proteases, fosfolipases entre outras. (Pitt e Barth, 1997; Franklin *et al.*, 2011).

*P. aeruginosa* pode ser isolada em ambientes como o hospitalar, na superfície de objetos, em piscinas, plantas, animais, solo, sendo que apresenta predileção por locais úmidos. Seres humanos saudáveis raramente são colonizados por esse microrganismo, em contrapartida, a presença em pacientes imunodeprimidos e previamente hospitalizados, é alta (Gomes, 1998; Hancock 1998; Zavascki *et al.*, 2004; Arai, 2011).

## 2.2 Importância Clínica

Os múltiplos mecanismos de resistência presentes nos BGN-NF é o maior problema no cenário hospitalar da América, destacando-se *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. (Casellas, 2011). *P. aeruginosa* é um agente comum em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) estando intimamente relacionado com procedimentos invasivos e com uso de dispositivos implantáveis. Pode causar infecções urinárias, infecções do trato respiratório inferior (em particular em pacientes sob ventilação mecânica), na pele (principalmente feridas) podendo causar bacteremia e septicemia (Kiska e Gilligan, 1999; Marra *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* é altamente prevalente em pacientes com Fibrose Cística sendo a principal causa de morbi-mortalidade, associado a doença pulmonar, neste pacientes (Liczak *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2003; Venezia, Ami e Carmeli, 2005; Casellas, 2011 Lutz, *et al.*, 2012)

Os carbapenêmicos (imipenem e meropenem), são opções para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, porém, o intenso uso desta classe de antimicrobiano tem favorecido a emergência de resistência (Arruda *et al.*, 1999; Laupland *et al.*, 2005). Os índices de resistência aos carbapenêmicos tem aumentado em todo o mundo, principalmente na América Latina (Sader *et al.*, 2004). No Brasil, segundo dados do SENTRY E MYSTIC, que avaliaram diferentes hospitais e regiões do país, as taxas de resistência na região Centro Oeste foram de 58,3% para imipenem e 50% para meropenem; região Sudeste 38,3% para imipenem e meropenem de 30,4% e região Sul, com 82,7% de resistência ao imipenem (Neves, *et al.*, 2011).

## 2.3 Mecanismos de Resistência em *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* possui fatores de resistência intrínsecos, considerado próprio da bactéria e extrínsecos, resultante de alterações fisiológicas ou estruturais que

podem ou não ser genéticos. Os mecanismos genéticos relacionados a aquisição de resistência podem ocorrer através de mutação, transdução, transformação ou conjugação bacteriana (Forbes *et al.*, 1998).

Os principais mecanismos de resistência associados à *P. aeruginosa* são:

A) Alteração de permeabilidade, dificultando a entrada de antimicrobianos, como os  $\beta$ -lactâmicos (mecanismo intrínseco); (Casellas, 2006). A alteração de permeabilidade está relacionada diretamente as porinas - proteínas responsáveis pela entrada de antimicrobianos na célula. Exemplo clássico de resistência ao imipenem, é a perda (ou alteração conformacional) da porina OprD canal de penetração quase exclusivo deste carbapenêmico (Livermore, 2001);

B) As bombas de efluxo - que agem expulsando da célula antimicrobianos; a super-expressão de determinadas bombas de efluxo acarreta resistência a diversos antimicrobianos como os aminoglicosídeos, quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (Livermore, 2001);

C) Produção de enzimas que degradam antibióticos: as principais enzimas são as  $\beta$ -lactamases - enzimas que hidrolizam o anel  $\beta$ -lactâmico dos fármacos, desestabilizando-os e conseqüentemente fazendo com que percam sua ação bactericida. Elas estão associadas a genes que podem ser encontrados no cromossomo ou no plasmídeo. As principais  $\beta$ -lactamases produzidas por *P. aeruginosa* que degradam vários  $\beta$ -lactâmicos são as metalo- $\beta$ -lactamases (MBL). As MBLs conferem resistência as cefalosporinas e aos carbapenêmicos; (Murphy, 2003; Poole, 2011).

As MBL pertencem à classe B (classificação de Ambler das  $\beta$ -lactamases) e apresentam grande importância clínica e epidemiológica sendo consideradas um problema de saúde pública. As MBL são consideradas carbapenemases, por sua capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos e todos os outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com exceção do aztreonam. As MBL possuem uma característica vital para sua ação – a necessidade de um metal para agir como co-fator da sua reação, o Zinco. (Murphy, 2003; Poole, 2011).

Diversas M $\beta$ L já foram identificadas em diferentes microrganismos, sendo a maior prevalência em *P. aeruginosa* (Tabela 1). Na atualidade foram descritas 11 variantes de MBL em diferentes regiões do mundo. Os locais de maior incidência da América Latina são o Brasil e Argentina (Bertoncheli, 2008; Neves *et al*, 2011).

TABELA 1. Metalo- $\beta$ -lactamases já descritas na literatura conforme país de descoberta, ano de isolamento e microrganismo de origem.

M $\beta$ L	PAÍS DE DESCOBERTA	ANO	MICRORGANISMO
IMP (Imipenemase)	Japão	1988 -1991	<i>Serratia marcescens</i> / <i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>
VIM (Verona Imipenemase)	Itália	1997	<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>
SPM (São Paulo metalo- $\beta$ - lactamase)	Brasil	2001	<i>P. aeruginosa</i> <sup>3</sup>
GIM (German imipenemase)	Alemanha	2002	<i>P. aeruginosa</i> <sup>4</sup>
SIM (Seoul imipenemase)	Coréia do Sul	2003-2004	<i>A. baumannii</i> <sup>5</sup>
AIM (Australian imipenemase)	Austrália	2007	<i>P. aeruginosa</i> <sup>6</sup>
KHM (Kyorin health science metalo- $\beta$ - lactamase)	Japão	1997	<i>Citrobacter freundii</i> <sup>7</sup>
NDM (New Delhi metalo- $\beta$ - lactamase)	Índia	2007	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>8</sup>
DIM (Dutch imipenemase)	Holanda	2007	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <sup>9</sup>
TMB-1 (Tripoli metalo- $\beta$ - lactamase)	Líbia	2009	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <sup>10</sup>
FIM (Florença Imipenemase)	Itália	2007	<i>P. aeruginosa</i> <sup>11</sup>

<sup>1</sup>Osano *et al.*, 1994, Watanabe *et al.*, 1991;<sup>2</sup> Bertocheli, Horner, 2008, Laureti *et al.*, 1999,<sup>3</sup> Toleman *et al.*, 2002, <sup>4</sup> Bertocheli, Horner, 2008, Castanheira *et al.*, 2004b, <sup>5</sup> Lee *et al.*, 2005;<sup>6</sup> De Figueiredo *et al.*, 2009;<sup>7</sup> Sekiguchi *et al.*, 2008;<sup>9</sup> Hardy *et al.*, 2012;<sup>10</sup> Poirel *et al.*, 2010;<sup>11</sup> El Salai *et al.*, 2012, Neves *et al.*, 2011;<sup>12</sup> Pollini *et al.*, 2012

## 2.4 Polimixina B

A família das polimixinas constitui-se de antimicrobianos polipeptídicos que possuem 5 integrantes, classificados como polimixina A, B, C, D, e, E, descritas no final da década de 40. A diferença entre elas é estrutural, onde a polimixina B possui um aminoácido D-fenilalanina substituído por uma D-leucina. A polimixina E é também conhecida como colistina e ambos são derivados do microrganismo *Bacillus* spp, sendo a polimixina B da subespécie *B. polymixia*, e a polimixina E da subespécie *B. colistinum*. As demais (A, C e D) não são utilizadas na prática clínica, devido sua alta toxicidade (Barnett, Bushby e Wilkinson, 1964; Horton e Pankey 1982).

A nefrotoxicidade foi um grande problema para as polimixinas de uso sistêmico e, por isso, deixadas de lado na década de 60. Os primeiros estudos relataram grande depósito deste fármaco nos tecidos, rins e no cérebro, sendo que 20 a 100% dos pacientes desenvolviam insuficiência renal (Wolinsky e Hines, 1963; Koch-Weser *et al.*, 1970; Price e Graham, 1970).

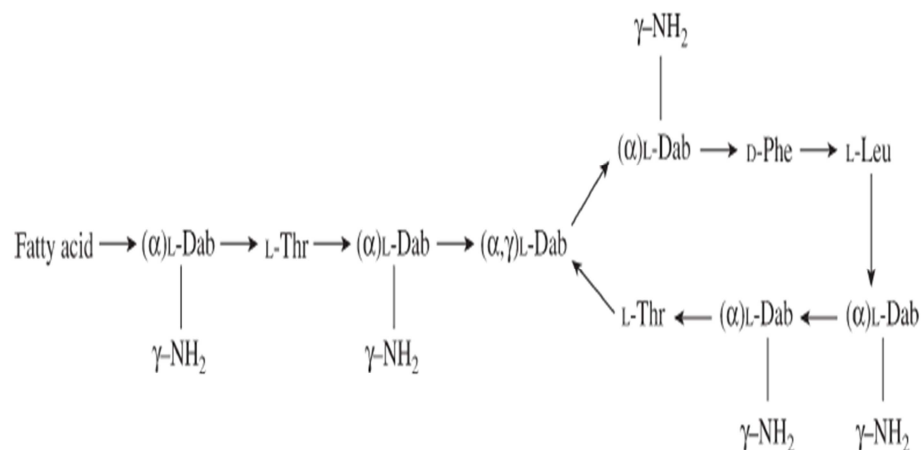
No final dos anos 40 e início dos anos 50 a indústria farmacêutica estava em expansão com os fármacos. A descoberta dos aminoglicosídeos, junto com os carbapenêmicos e as cefalosporinas favoreceu a substituição da polimixina B e E, por estas drogas. Estava iniciando um marco para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* também com a descoberta da gentamicina, em 1963 (Gonzalez e Spencer, 1998).

O baixo teor de toxicidade, quando comparada às polimixinas, fez crescer o uso de outros antibióticos, tais como: aminoglicosídeos, carbapenêmicos e cefalosporinas. Entretanto, o uso excessivo destes possibilitou a emergência de cepas MDR. Este fato fez com que os antibióticos mais antigos voltassem a despertar o interesse farmacêutico, retornando assim as polimixinas, como uma boa opção terapêutica já que novos fármacos antipseudomonas não surgem há anos no mercado. (Falagas e Kasiakou, 2005; Balaji, Jeremiah e Baiga 2011).

As polimixinas possuem um espectro de atividade contra grande parte das bactérias de importância clínica. Entre elas estão as Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Haemophilis* sp.; e alguns BGN-NF como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp (Kucers, 1997; Ouderlirk, *et al.*, 2003; Ladman *et al.*, 2008)

O mecanismo de ação da polimixina B é semelhante a uma ação detergente. Ocorre através da desestabilização da parede celular bacteriana pela alteração da permeabilidade celular. Os constituintes da estrutura da polimixina B compreendem quatro compostos relacionados, polimixina B1 (ácido 6-metiloctanóico), B2 (ácido 6-metilheptanóico) – maiores constituintes, B3 e B4. A diferença entre eles é a cadeia de ácido graxo (figura 1). A ligação do anel polipeptídico catiônico é feita ao lado de uma cadeia lateral de ácido lipofílico e este com porções de fosfatos aniônicos da membrana celular. Este último provoca a saída de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mg}^{2+}$ ) que são elementos vitais para a integridade da membrana celular, estimulando o aumento da permeabilidade da membrana, saída dos constituintes internos e consequente morte celular. (Barnett, Bushby e Wilkison, 1960; Schwartz *et al.*, 1960; Young *et al.*, 1992; Orwa *et al.*, 2001; Kwa *et al.*, 2007; Zavascki *et al.*, 2007).

FIGURA 1. Estrutura da Polimixina B. Ácido graxo: ácido 6-metiloctanóico para B1, ácido 6-metil-heptanóico para B2, ácido octanóico para B3 e ácido heptanóico para B4. Thr: treonina; Leu: leucina; Dab: ácido alfa gama diaminobutírico; Phe: fenilalanina; onde  $\alpha$  e  $\gamma$  indicam o grupo amino envolvidos na a ligação peptídica.



FONTE: Adaptado de Zavascki *et al.*, 2007.



As polimixinas são consideradas dose-dependentes, devido à morte pela ligação na parede citoplasmática bacteriana. Isto faz com que a célula sofra lise independente da entrada do antimicrobiano e, por isso, a resistência a polimixina B não é associada com perda de porinas e bombas de efluxo. (Landman *et al.*, 2008).

Atualmente não há padronização para avaliar a susceptibilidade *in vitro* a polimixina pelo método de disco-difusão para diversas bactérias. Para avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro*, o método recomendado é a microdiluição em caldo, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os pontos de corte da CIM, segundo o CLSI (2011), para polimixina B e *P. aeruginosa* é até 2 µg/mL para sensibilidade, 4 µg/mL intermediário e acima de 8 µg/mL, resistente.

*P. aeruginosa* é tipicamente sensível às polimixinas. Poucos casos de resistência de *P. aeruginosa* são relatados o que a torna um antibiótico potencialmente eficaz no tratamento de infecções graves. A nefrotoxicidade relatada é baixa, sendo o principal fator de risco, pacientes com idade avançada (Zavascki *et al.*, 2004; Landman *et al.*, 2008)

## 2.5 Heteroresistência

O fenômeno da heteroresistência não tem uma definição pré-estabelecida que possa ser aplicada para todos os antimicrobianos (Martínez, 2008). Ela é dependente de fatores como o microrganismo, antimicrobiano, epidemiologia local, fenótipos de resistência desenvolvidos pela bactéria, testes de triagem, entre outros. (Tomasz *et al.*, 1991, Yamazumi, *et al.*, 2003, Plipat *et al.*, 2005). Entretanto, é utilizada uma terminologia genérica, que definiu-a como crescimento de uma subpopulação resistente, a partir de uma população sensível (Rinder, 2001)

Os primeiros estudos com heteroresistência foram com *Staphylococcus aureus* e vancomicina (Kayser *et al.*, 1989). Em seguida as pesquisas continuaram com *Staphylococcus* coagulase negativa (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. articularis*, *S. simulans*, *S. warneri*) para vancomicina e meticilina (Cimolai *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1999); *Enterococcus faecium* para os glicopeptídeos (Alam *et al.*, 2001),

*Streptococcus pneumoniae* para penicilina (Morand e Muhlemann, 2007), *Klebsiella pneumoniae* para os carbapenêmicos (Pounaras *et al.*, 2010), *Acinetobacter baumannii* tanto para os carbapenêmicos (Ikonomidis *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011) como para a colistina (Li *et al.*, 2006; Tam, Li e Naton, 2007; Hawley, Murray e Jorgensen, 2008; Wing Yau *et al.*, 2009 Herrera, Mobilia e Posse, 2011) e *P. aeruginosa* para os carbapenêmicos (Pounaras *et al.*, 2007).

Subpopulações resistentes crescendo dentro de uma população microbiana sensível, não são investigadas na rotina laboratorial. Porém, alguns testes de susceptibilidade podem prever o crescimento, como o disco difusão (TSA) e o Etest<sup>®</sup>/MICE<sup>®</sup> (Lo-Ten-Foe *et al.*, 2007, Pounaras *et al.*, 2007). O Etest<sup>®</sup> e o MICE<sup>®</sup> determinam, assim como a microdiluição em caldo, a concentração inibitória mínima. Através da microdiluição em caldo, não é possível detectar o fenótipo da heteroresistência.

O PAP (perfil de análise populacional) quantifica a subpopulação, através de uma diluição seriada, em placas de *Petri*, com meio de cultura e concentrações crescentes de antibiótico. Avalia-se o crescimento, de acordo com a CIM inicial do isolado bacteriano e acompanha-se o desenvolvimento de UFC (unidades formadoras de colônia) nas placas com concentração crescente de antimicrobiano. A frequência populacional é a razão do número de UFC da placa com maior concentração de antimicrobiano em que houve crescimento, pelo número de UFC da placa sem antibiótico.

Poucos relatos são descritos com investigação de heteroresistência em *P. aeruginosa*. Não há ainda um entendimento completo sobre o significado clínico de isolados heteroresistentes. A avaliação de heteroresistência é importante para prever a efetividade clínica da terapia antimicrobiana, e também para a detecção de tendências de resistência de isolados de *P. aeruginosa* (Hiramatsu *et al.*, 1997; Falagas *et al.*, 2008).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo principal**

Investigar a heteroresistência à polimixina B em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos, provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

#### **3.2 Objetivos secundários**

3.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) à polimixina B para todos isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

3.2.2 Verificar e estimar a presença de subpopulações heterogêneas nos isolados sensíveis e resistente aos carbapenêmicos de *P. aeruginosa*.

3.2.3 Determinar a prevalência de heteroresistência à polimixina B em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

3.2.4 Pesquisar a presença de MBL nos isolados com resistência aos carbapenêmicos e relacionar esse resultado com a presença de subpopulações resistentes.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

- Alam MR, Donabedian S, Brown W, Gordon J, Chow JW, Zervos MJ, Hershberger E (2001). Heteroresistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*. **J Clin Microbiol**; 39:3379-81.
- Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader AS (2003). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). **J Antimicrob Chemother** 52: 140–1.
- Arai H (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol** 103:01-13.
- Arruda EA, Marinho IS, Boulos M, Sinto SI, Caiaffa HH, Mendes CM, Oplustil CP, Sader H, Levy CE, Levin AS (1999). Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Control Hosp Epidemiol** 20:620-623.
- Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR (2011). Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. **Indian J Med Microbiol** 29:230-42
- Barth AL, Pitt TL (1998). Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus in *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Diases**, v.2, n. 2, p. 43-61,
- Barnett MSR, Bushby, Wilkinson S (1964). Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. **Br. J. Pharmacol** 23:552–574
- Bertoncheli, CM, Horner R (2008). *Uma revisão sobre metalo-  $\beta$ -lactamase*. **Rev Bras de Ciências Farmacêuticas** 44 (4): 577-599.
- Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN (2004). Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrob Agents Chemother** 48:2344–2345.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schimdt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a  $\beta$ - Lactamase Gene, bla<sub>GIM-1</sub>, Encoding a New Subclass of Metallo-  $\beta$ - Lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, 48 (12): 4654-4661, 2004b.

Casellas JM (2006). Comité de Resistencia a Antibacterianos. Resultados de la 7<sup>a</sup> encuesta Del Comité de Resistencia a Antimicrobianos de la Asociación Panamericana de Infectología. **Rev Panam Infectol** 8(3):48–5

Casellas JM (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. **Rev Panam Salud Publica** 30(6):519–28.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21th informational supplement. vol. 31, no. 1, M100-S20. Wayne, PA: **CLSI**.

Cimolai N, Trombley C, Zaher A (1997). Oxacillin susceptibility of coagulase-negative staphylococci: role of macA genotype and Etest susceptibility testing. In **J Antimicrob Agents** 8, 121-125

De Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, De Mondino SSB (2009). Detecção de metalo-beta-lactamase em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **J Bras Patol e Med Lab** 45 (3): 177-184

El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen O, Walsh TR (2012). Genetic and Biochemical Characterization of a Novel Metallo- $\beta$ -Lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* Strain Isolated in Tripoli, Lybia. **Antimicrob Agents Chemother** 56 (5): 2241-2245

Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK (2008). Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clin Microbiol Infect** 14:101-4.

Falagas ME, Kasiakou SK (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis** 40:1333-41.

Forbes BA, Sahan DF, Weissfeld AS (1998). Principles of antimicrobial action and resistance: *Pseudomonas*, *Bulkoderia* and similar organism. IN BAYLEI (ed). **Diagnostic Microbiology**.10<sup>th</sup>. Ed. New York: Morby, 234-272,448-461.

Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. **Front Microbiol** 2:167.

Gomes EA (1998). Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. **Rev Soc Bras Med Trop** 31(5):503-4.

Gonzalez LS, Spencer JP (1998). Aminoglycosides: A Practical Review. **Americ Acad of Family Phisicians** 58 (8): 1811-1820.

Hancock (1998) REW. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. **Clin Infect Dis** 27(1):S93–9.

Hardy EE, Mermel LA, Chapin KC, Alpert W, Vanner C, Gupta E (2012). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Containing New Delhi Metallo-Beta-Lactamase in Two Patients – Rhode Island. **Centers for Disease Control and Prevention: Morbidity and Mortality Weekly Report**, 61 (24): 446-448, 2012.

Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR (2011). Sensibilidad de Acinetobacter a la colistina evaluada mediante lós métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Detección de aislamieron heterorresistentes. **Rev Argent Microb** 115-119.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet** 350, 1670–1673.

Horton J, Pankey JM (1982). Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. **Med Clin N Am** 66:135–142.

Ikonomisis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pounaras S (2009). Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. **J of Clin Microb** 4055-4059.

Kayser FH, Morenzoni G, Strassle A, Hadorn K. (1989). Activity of meropenem, against Gram-positive bacteria. **J Antimicrob Chemother** 24 Suppl. A, 101–112.

Kiska DL, Gilligan PH (1999). *Pseudomonas* and *Brucella*. In: Murray P.R., Baron EJ., Tenover FC, Tenover FC, **Manual of clinical Microbiology** p. 517-25.

Koch-Weser JW, Sidel EB, Federman P, Kanarek DC, Finer, Eaton, EA (1970). Adverse effects of sodium colistimethate—manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. **Ann Intern Med** 72:857–868.

Kucers AS, Crowe ML, Grayson, Hoy J (ed.) (1997). **Polymyxins the use of antibiotics**, 5th ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, England 667–675.

Kwa A, Kasiakou SK, Tam VH, Falagas ME (2007). Polimixin B: similarities to and differences from colistin (polimixin E). **Expert Rev Anti Infect Ther** 5:811-21.

Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. (2005). Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. **J Antimicrob Chemother** 55:954-7.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini G (1999). Cloning and Characterization of bla VIM, a New Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. **Antimicrob Agents Chemother** 43 (7): 1584-1590.

Laupland K, Perkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JDD (2005). Population based epidemiological study of infections caused by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-B-lactamase (MBL)-producing strains. **J Infect Dis** 192:1606-12.

Lee HY, Chen CL, Wang SB, Su LH, Chen SH, Liu SY, Wud TL, Lin TY, Chiu CH. (2011). Imipenem heteroresistance induced by imipenem in multidrug-resistant

*Acinetobacter baumannii*: mechanism and clinical implications. **Intern J Antim Agents** 37 302–308.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y (2005). Novel Acquired Metallo-  $\beta$ - Lactamase Gene, bla SIM-, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother** 49 (11): 4485-449.

Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, K , Tan KE, Liolios L (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, **Antimicrob Agents Chemother** 2946-2950.

Livermore DM (2001). Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother** 47, 247-250.

Livermore DM (2002). The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. **Curr Opin Investig Drugs** 3, 218–224.

Lopes HV (2009). The treatment of severe infections by *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev Panam Infectol** 11(3):74-76.

Lutz L, Pereira DC, Paiva RM, Zavascki AP, Barth AL (2012). Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. **BMC Microbiol** 8;12:196.

Lo-Ten-Foe JRA, Smet MGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, Van Keulen PHJ (2007). Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrob Agents Chemother** 51:3726–3730.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002). Lung Infections Associated With Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev** 15:194–222.

Martínez LM. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 26 (8), 481-4.



Marra AR, Pereira CA, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, Edmond MB, Faro C, Wey SB (2006). Bloodstream infections with metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology and clinical outcomes. **Antimicrob Agents Chemother** 50:388-390.

Morand B, Muhlemann K (2007). Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 104:14098-103.

Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Ed) (1999). Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed Washington: **Am Society for Microbiology**, 517-525.

Murphy TA, SIM AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR (2003). Biochemical Characterization of the acquired Metallo-  $\beta$ -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 582-587.

Neves PR, Mamizuka EM; Levy CE; Lincopan N (2011). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **J Bras Patol Med Lab** 47 (4) 409-420.

Nordmann P, Naas T (1994). Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother** 38:104–114.

Orwa JA, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J (2001). Isolation and structural characterization of colistin components. **J Antibiot (Tokyo)** 54:595–9.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N (1994). Molecular Characterization of an Enterobacterial Metallo- $\beta$ -Lactamase Found in a Clinical Isolate of *Serratia marcescens* That shows Imipenem Resistance. **Antimicrob Agents Chemother** 38 (1): 71-78, 1994

Ouderkirk JP, Nord JA, Turett GS, Kislak JW (2003). Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother** 47: 2659–2662

Pitt TL, Barth AL (1997). *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonas*. In: Emerson, A.M. (Ed) **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. London: Wiley & Sons, p.493-517

Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. **J Clin Microbiol** 43:3129-3135.

Plipat N, Livni G, Bertram H, Thomson RB., Jr (2005). Unstable vancomycin heteroresistance is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol** 43, 2494–2496.

Poole K (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Front in Microbiol** 21-13.

Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, *et al* (2000). VEB-1-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. **Emerg Infect Dis** 17:468–470.

Poirel L, Rodríguez- Martínez J M, Al Naiemi N, Debets -Ossenkopp YJ, Nordmann P (2010) Characterization of DIM-1, a Integron-Encoded Metallo-  $\beta$ - Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. **Antimicrob Agents Chemother** 54 (6): 2420-2424

Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini G M (2012). FIM-1, a new acquired metallo-  $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrob Agents Chemother** “no prelo”.

Pounaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A (2007). Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. **J Med Microb** 56, 66–70

Pounaras S, Kristo L, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, Tsakris A (2010). Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. **J Clin Microbiol** 2601-2604.

Price DJE, Graham DI (1970). Effects of large doses of colistin sulfomethate on renal function. **Br Med J** 4:525–527.

Rinder H (2001). Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy? **J Med Microbiol** 50, 1018–1020.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC (2004). SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis** 8(1) 25-79

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T (2008). KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo-  $\beta$ -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother** 2 (11): 4194-4197

Schwartz BSM, Warren R, Barkley FA, Landis L. 1960. Microbiological and pharmacological studies of colistin sulphate and sodium colistin methanesulfonate. **Antibiot Ann** 1959–1960:41–60.

Tam VH, Schilling AN, Vo G, Kabbara S, Kwa AL, Wiederhold NP, Lewis RE (2005). Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 49(9): 3624-30.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel Metallo-  $\beta$ -Lactamase isolated in Latin América: report from the SENTRY antimicrobial surveillance progame. **J Antimicrob Chemoter** 50: 673-679

Tomasz A, Nachman S, Leaf H. (1991). Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrob Agents Chemother** 35, 124–129.

Tortora GJ., Funke BR., Case CL (2005). **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed.

Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, Boyken L, Hollis RJ, Furuta I, Jones RN (2003). Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol** 41, 267–272.

Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RW (1992). Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. **Antimicrob Agents Chemother** 36:2566–2568.

Watanabe M, Iyobes S, Inoube M, Mitsuhashi S (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 35 (1): 147-151, 1991.

Wing-Yau, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, YU HH, Nation RL, LI J (2009). Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant acinetobacter baumannii clinical isolates from the western pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J of Infection** 138-144.

Wolinsky E, Hines JD (1963). Neurotoxic effects of colistin in patients with renal disease. **N. Engl. J. Med** 266:759–762.

Wong SSSY, Ho PL, Woo PCY (1999). Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. **Clin Infect des** 70: 760-767.

Wong A, Rodrigue N, Kassen R (2012). Genomics of Adaptation during Experimental Evolution of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **PLOS Genetics** 8 (9) 1-13.

Vahaboglu HR, Ozturk G, Aygun F, Coskuncan A, Yaman A, Kaygusuz H, Leblebicioglu I, Balik K, Aydin, Otkun M (1997). Widespread detection of PER- 1–type extended-spectrum b-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother** 41:2265–9.

Vanezia AN, Ami RB e Carmeli Y (2005). Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. **Cur Opin Infec Diseas** 18:306–313

Zavascki PA, Cruz RP, Goldani LZ. (2004). Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case–control studies in hospitalized patients. **J Hosp Infect** 59: 96-101.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother** 60:1206-15.

## 5. ARTIGO EM INGLÊS (Submitted to Journal of Medical Microbiology)

Evaluation of heteroresistance to Polymyxin B among carbapenem-susceptible and – resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Djuli M. Hermes<sup>1</sup>, Caroline Pormann<sup>2</sup>, Larissa Lutz<sup>3</sup>, Aline B. Teixeira,<sup>1</sup> Vanessa B. Ribeiro<sup>4</sup>, Bárbara Netto<sup>1</sup>, Andreza F. Martins<sup>5</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>1,6</sup>, Afonso L. Barth<sup>1,4,7</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; <sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, UFRGS , Brazil; <sup>3</sup>Unidade de Microbiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Brazil; <sup>5</sup>Universidade Metodista de Porto Alegre, Brazil, <sup>6</sup> Infectious Disease Service, HCPA, Brazil, <sup>7</sup>Serviço de Patologia Clínica, HCPA, Brazil

Corresponding author:

Afonso Luis Barth

albarth@hcpa.ufrgs.br

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

**Abstract**

One hundred and twenty-four *Pseudomonas aeruginosa* isolates were selected for antimicrobial susceptibility testing (AST) with anti-pseudomonal agents, minimum inhibitory concentration (MIC) determination for polymyxin B, and metallo-beta-lactamase (MBL) detection (genes *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>IMP</sub>). According to imipenem and/or meropenem susceptibility profile, a set of randomly selected isolates (12 isolates carbapenem-susceptible and 12 isolates carbapenem-resistant) were evaluated for heteroresistance to polymyxin B. Heteroresistance testing was performed by plating the isolates onto increasing concentrations of polymyxin B (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0 mg l<sup>-1</sup>). The population analysis profile (PAP) was defined as the ratio of the number of colony-forming units (CFU) on the plate with the highest concentration of polymyxin B at which bacterial growth occurred by the number of CFU on the plate without antibiotic. Isolates presenting subpopulations that exhibited growth at polymyxin B concentrations  $\geq 2$  mg l<sup>-1</sup> were considered heteroresistant. Isolates containing subpopulations that grew at polymyxin B concentrations at least twice as high as the original MIC but  $< 2$  mg l<sup>-1</sup> were considered heterogeneous. AST results indicated a variable degree of susceptibility: high levels of resistance to gentamicin (30.6%) and imipenem (29.0%); low levels of resistance to aztreonam (1.6%) and ciprofloxacin (4.8%). All isolates were susceptible to polymyxin B: MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 1 mg l<sup>-1</sup> and 2 mg l<sup>-1</sup> respectively. Thirty-seven isolates (30%) were carbapenem-resistant. Four isolates resistant to carbapenems were positive for *bla*<sub>IMP</sub>. There were no heteroresistant subpopulations in the carbapenem-susceptible group, but 3 isolates presented heterogeneous subpopulations. The PAP frequency ranged from  $2.1 \times 10^{-4}$  to  $6.9 \times 10^{-8}$ . In the carbapenem-resistant group, one isolate was heteroresistant. Six isolates in this group presented heterogeneous subpopulations. In the resistant population, the PAP frequency ranged from  $2.1 \times 10^{-7}$  to  $2.6 \times 10^{-4}$ . In this study, polymyxin B heteroresistance in *P. aeruginosa* was uncommon and occurred in only one carbapenem-resistant isolate, despite the fact that several isolates presented heterogeneous subpopulations with increased polymyxin B MICs.

**Keywords:** Heteroresistance, polymyxin B, carbapenems

## Introduction

Therapeutic options for *Pseudomonas aeruginosa* infection are limited due to the diversity of resistance mechanisms developed by this pathogen and due to the high frequency of multidrug resistant isolates. Carbapenems are the main class of antibiotics used in the treatment of *P. aeruginosa* infection. Despite of this fact, carbapenem-resistant isolates have been frequently reported worldwide. The main mechanism involved in this resistance is the

production of carbapenemases such as metallo beta-lactamases (MBL), which prevent the activity of beta-lactams drugs (Casellas 2011; Poole et al., 2011). Thereby, polymyxin B remains as an option for treatment of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infections (Zavascki et al., 2007).

The resistance generated by mechanisms such as the MBL production usually occurs homogeneously among the bacterial population. However, a distinct resistance phenotype, named heteroresistance, has been reported. This phenomenon can be defined as the growth of resistant subpopulations among an antimicrobial-susceptible population (Pounaras et al., 2005a; Li et al., 2006; Tam et al., 2007; Pounaras et al., 2008c; Hawley et al., 2008; Ikonomidis et al., 2009, Wing Yau et al., 2009 Herrera et al., 2011). The clinical impact of heteroresistance has yet to be elucidated. Some authors suggest that this phenotype may account for unexplained treatment failures (Rinder et al., 2001; Pounaras et al., 2007b). As there is few information about heteroresistance and no investigation has addressed polymyxin B in *P. aeruginosa*, the aim of the present study was to investigate this phenomenon to polymyxin B in a set of carbapenem-susceptible and resistant *P. aeruginosa* isolates.

## **Methods**

### **Bacterial isolates and susceptibility testing**

One hundred and twenty-four *P. aeruginosa* isolates were randomly obtained at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil, throughout the year 2011. Antimicrobial susceptibility testing (AST) was performed by disc-difusion for all isolates against amikacin, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, tobramycin, and aztreonam, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). The susceptibility to carbapenems (imipenem and meropenem) and to cephalosporins (cefepime and ceftazidime) was also evaluated by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC). The susceptibility to polymyxin B was determined only by MIC for all isolates.

### **Phenotypic and genotypic characterization of MBL**



Phenotypic detection of MBL was performed as previously described by Arakawa et al. (2000). Isolates were evaluated for the presence of *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> genes by qualitative PCR (Martins et al., 2007; Monteiro et al., 2012). Water free of DNases and RNases was used as negative control and as positive controls were used: *P. aeruginosa* 48-1997As (SPM-1+), *P. aeruginosa* 395 (IMP+), *P. aeruginosa* 81-11963A (VIM+) and *K. pneumoniae* NCTC BAA2146 (NDM-1+), kindly provided by the “Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil”.

Isolates with positive results for carbapenemase production by PCR were confirmed by genome sequencing. PCR products were purified using ExoStar kit (GE Healthcare) and sequenced using a BigDye Terminator version 3.1 and an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions.

### Population analysis

A total of 24/124 (12 carbapenem-susceptible and 12 carbapenem-resistant) epidemiologically unrelated isolates were randomly selected for polymyxin B population analysis. Isolates were tested in duplicate using serial dilutions using a 0.5 **McFarland** standard inoculum on Mueller–Hinton (MH) agar plates containing increasing concentrations of polymyxin B (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0 mg l<sup>-1</sup>). *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used for quality control. The population analysis profile (PAP) was defined as the ratio of the number of colony-forming units (CFU) on the plate with the highest concentration of polymyxin B in relation to the control plate (with no antibiotic). Colonies that grew at the highest concentrations of polymyxin B were passed through 5 days in antibiotic-free MH agar for further determination of polymyxin B MICs. Isolates containing subpopulations that grew at polymyxin B concentrations >2 mg l<sup>-1</sup> were considered heteroresistant. Isolates containing subpopulations that grew at polymyxin B concentrations at least twice as high as the original MIC but ≤2 mg l<sup>-1</sup> were considered heterogeneous.

### Results

All 124 isolates were susceptible to polymyxin B, with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of 1 mg l<sup>-1</sup> and 2 mg l<sup>-1</sup>, respectively. There was variable susceptibility to other antimicrobials: high level of resistance to gentamicin (30.6%) and imipenem (29.0%); and low level of resistance to aztreonam (1.6%) and ciprofloxacin (4.8%). Thirty-seven isolates (30%) were resistant to

carbapenems. These isolates also presented high MIC<sub>90</sub> values (32 mg l<sup>-1</sup>) for cefepime and ceftazidime. Overall, 16 of these 37 isolates (43%) presented positive results in the phenotypic screening for MBL. However, in only 4 (10%) isolates a MBL gene was detected by PCR. This gene was identified as the *bla*<sub>IMP</sub> which was confirmed by sequencing.

The two groups (12 carbapenem-susceptible isolates – group S; and 12 carbapenem-resistant isolates - group R) presented a marked difference in the susceptibility profile: isolates in group R were mostly resistant to other antimicrobials regardless of the susceptibility method (Table 1). In the group S, there was no heteroresistant subpopulation, whereas 3 isolates (isolates A, F, and G) presented heterogeneous subpopulations (Table 2). The PAP ranged from 6.9x10<sup>-8</sup> to 2.1x10<sup>-4</sup>. In the group R, 1 isolate was characterized as heteroresistant (isolate M) and 6 other isolates (isolates N, O, P, T, V, X) presented heterogeneous subpopulations. The PAP growth frequency ranged from 2.1x10<sup>-7</sup> to 2.6x10<sup>-4</sup> (Table 2).

In the heterogeneous subpopulations and the single heteroresistant isolate, MICs remained stable even after 5 days of passage through an antibiotic-free medium. Population analysis of group S and group R isolates of polymyxin B presented distinct subpopulations. Only 2 carbapenem-susceptible isolates exhibited subpopulation growth at a polymyxin B concentration of 2 mg l<sup>-1</sup>. Conversely, 5 of the 12 carbapenem-resistant isolates exhibited subpopulation growth at a polymyxin B concentration of 2 mg l<sup>-1</sup> (Figures 1 and 2). Of the 12 isolates selected to the population analysis, only one (isolate U) was positive for the *bla*<sub>IMP</sub> gene.

## Discussion

Heteroresistance is characterized by the development of an antimicrobial-resistant subpopulation within an otherwise susceptible bacterial population. This phenomenon is dependent on various factors such as the microorganism, the antimicrobial, local epidemiology, resistance phenotypes and testing methods (Tomasz et al., 1991; Yamazumi et al., 2003; Plipat et al., 2005). Among the non-fermenting Gram-negative bacteria, *Acinetobacter baumannii* has been tested for heteroresistance to carbapenems (Pounaras et al., 2005; Ikonomidis et al., 2009) and colistin (Li et al., 2006; Tam et al., 2007; Hawley et al., 2008; Wing Yau et al., 2009 Herrera et al., 2011). There has been little investigation of heteroresistance in *P. aeruginosa*. Some of these few studies detected distinct subpopulations exhibiting heteroresistance to carbapenems and to piperacillin/tazobactam (Pounaras et al., 2007; Pounaras et al., 2008).

The present study assessed heteroresistance and heterogeneous susceptibility to polymyxin B among carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates. Among the 24 isolates evaluated, only one was detected as heteroresistant, suggesting that this phenomenon is less frequent to polymyxin B than to carbapenems for *P. aeruginosa* isolates (Pounaras et al., 2007). On the other hand, several isolates presenting heterogeneous subpopulations were detected and this phenotype was mainly associated to the group R (50% of the isolates compared to 25% in the group S). Moreover, the higher MICs of heterogeneous subpopulations were confirmed after the passages in antibiotic-free medium, indicating a stable phenotype. This stability seems to be peculiar to *Pseudomonas* sp., as similar results were already reported for isolates tested against carbapenems (Pounaras et al., 2007). In contrast, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. heteroresistant isolates tend to present subpopulation MICs which returned to the lower values after a period of absence of drug exposure (Pounaras et al., 2005; Pounaras et al., 2010). Considering that the use of polymyxin B may lead to the selection of resistant mutants, the presence of heterogeneous subpopulation may represent a serious concern, due to the fact that this antimicrobial is frequently used as the drug of choice to treat carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infection. However, as we did not evaluate the clinical outcomes of patients which presented heteroresistance or heterogeneous *P. aeruginosa* subpopulation, the clinical impact of these phenomena remain to be investigated. Interestingly, no relationship was found among the carbapenemase production and the resistance phenotypes observed. To the best of our knowledge, this is the first evaluation of polymyxin B heteroresistance in *P. aeruginosa* isolates.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **References**

**Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fugiwara, H., & Goto, M. (2000).** Convenient test for screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-producing Gram-Negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* **38**, 40-43.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21th informational supplement. vol. 31, no. 1, M100-S20, Wayne, Pa.

**Hawley, JS., Murray, CK., & Jorgensen JH. (2008).** Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 351-352.

**Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., & Kobayashi, I. (1997).** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**, 1670–1673.

**Ikonomisis, A., Neou E., Gogou V., Vrioni G., Tsakris A., & Pounaras, S. (2009).** Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **47**, 4055-4059.

**Li, J., Rayner, CR., Nation, RL., Owen, RJ., Spelman, DK., Tan, KE., & Liolios, L. (2006).** Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2946-2950.

**Martins, A.F., Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B., Barth, A.L. (2007).** Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* **35**, 457-460.

**Monteiro, J., Widen, RH., Pignatari, AC., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012).** Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* **67**, 906-9.

**Plipat, N., Livni, G., Bertram, H. & Thomson, RB., Jr (2005).** Unstable vancomycin heteroresistance is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**, 2494–2496

**Poole, K. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front in Microbiol* **2**, 21-13.

- Pounaras, S., Ikonomidis, Markogiannakis, A., Maniatis, A. N., & Tsakris, A. (2005).** Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **55**, 1055–1056.
- Pounaras, S., Ikonomidis, A., Markogiannakis, NS., Maniatis, NA., & Tsakris, A. (2007).** Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J Med Microbiol* **56**, 66–70.
- Pounaras, S., Ikonomidis, A., Neou, E., Kantzanou M., Maniatis NA., Tsakris, A. (2008).** Piperacillin/tazobactam-heteroresistant *Pseudomonas aeruginosa* from urinary infection, successfully treated by piperacillin/tazobactam. *J Antimicrob Chemother* **61**, 757-758.
- Rinder, H. (2001).** Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy? *J Med Microbiol* **50**, 1018–1020.
- Sader, HS., Jones, RN., Gales, AC., Silva, JB., & Pignatari, AC., (2004).** SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* **8**, 25-79
- Tam, VH., Schilling, AN., Vo, G., Kabbara, S., Kwa, AL., Wiederhold, NP.,& Lewis, RE. (2005).** Pharmacodynamics of polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3624-30.
- Tomasz, A., Nachman, S., & Leaf, H. (1991).** Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 124–129.
- Yamazumi, T., Pfaller, MA., Messer, SA., Houston, AK., Boyken, L., Hollis, RJ., Furuta, I. & Jones, RN. (2003).** Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* **41**, 267–272.
- Wing-Yau, Owen, RJ., Poudyal, A., Bell, JM., Turnidge, JD., Yu, HH., Nation, RL., & Li, J. (2009).** Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant acinetobacter baumannii clinical isolates from the western pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect* **58**, 38-144.
- Zavascki, AP., Goldani, LZ., Li, J., Nation, RL. (2007).** Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob. Chemother* **60**, 1206-15.

Table 1. Profile of carbapenem-susceptible (group S) and carbapenem-resistant (group R) *P. aeruginosa* isolates

Isolate	CF	Origin	Susceptibility (MIC, mg l <sup>-1</sup> )				Resistance profile *
			IPM	MEM	FEP	CAZ	
<b>Group S</b>							
A		Ascitic fluid	S (0,5)	S (≤0,5)	S (1)	S (1)	-
B	Yes	Sputum (trap)	S (0,5)	S (0,5)	S (2)	S (1)	-
C		Blood	S (0,5)	S (≤0,5)	S (1)	S (1)	-
D		Sputum	S (0,5)	S (≤0,5)	S (2)	I (16)	TZP, TIM
E		Blood	S (≤0,5)	S (0,5)	S (1)	S (1)	-
F		Sputum	S (0,5)	S (0,5)	S (1)	S (1)	-
G		Sputum	S (≤0,5)	S (≤0,5)	S (1)	S (1)	-
H	Yes	Sputum	S (0,5)	S (0,5)	S (1)	S (1)	-
I	Yes	Sputum	S (0,5)	S (0,5)	S (1)	S (1)	TZP, SAM
J	Yes	Sputum	S (1)	S (≤0,5)	S (4)	S (0,5)	-
K	Yes	Sputum	S (1)	S (0,5)	R (32)	R (32)	-
L	Yes	Sputum	S (≤0,5)	S (0,5)	S (1)	S (1)	AMK, GEN, SAM
<b>Group R</b>							
M		Sputum	R (16)	R (16)	R (32)	R (32)	AMK, CIP, GEN, TZP, TIM
N		Sputum	R (8)	R (16)	R (32)	R (32)	AMK, CIP, GEN, TZP, TIM, ATM
O		Sputum (trap)	R (32)	R (64)	R (64)	R (64)	CIP, GEN, TIM
P		Blood	R (16)	R (16)	R (32)	R (32)	-

Q		Sputum	R (8)	S (1)	S (1)	S (1)	GEN, TIM
R	Yes	Sputum	R (16)	R (16)	R (32)	R (32)	AMK, GEN, TZP, TIM, SAM
S		Urine	R (8)	S (1)	R (64)	R (64)	AMK, CIP, GEN, TZP, SAM
T		Urine	R (8)	I (4)	S (8)	S (8)	SAM
U		Secretion	R (16)	R (8)	S (8)	S (8)	GEN, SAM
V		Blood	R (8)	R (8)	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	-
X		Ascitic fluid	R (8)	R (8)	S (1)	S (1)	TZP, SAM
Z	Yes	Sputum	R (8)	R (16)	S (8)	S (8)	AMK, GEN, TZP, SAM

CF, cystic fibrosis; S, susceptible (carbapenems: MIC  $\leq 2$  mg  $\Gamma^{-1}$ ; cephalosporins: MIC  $\leq 8$  mg  $\Gamma^{-1}$ ); I, intermediate (carbapenems: MIC =4 mg  $\Gamma^{-1}$ ; cephalosporins: MIC =16 mg  $\Gamma^{-1}$ ); R, resistant (carbapenems: MIC  $\geq 8$  mg  $\Gamma^{-1}$ , cephalosporins: MIC  $\geq 32$  mg  $\Gamma^{-1}$ ). AMK, amikacin. ATM, aztreonam. CIP, ciprofloxacin. GEN, gentamicin. SAM, ampicillin/sulbactam. TZP, piperacillin/tazobactam. TIM, ticarcillin/clavulanic acid.

\* Disk diffusion method in accordance with CLSI.

Table 2. Populational analysis of *P.aeruginosa* carbapenem-susceptible (Group S) and carbapenem-resistant (Group R) to polymyxin B.

Isolate	Original PMB MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Highest PMB concentration at which bacterial growth occurred ( $\mu\text{g/mL}$ )	Classification	PAP frequency
Group S				
A	0.25	1.0	H	$3.0 \times 10^{-4}$
B	1.0	0.5	-	$2.0 \times 10^{-6}$
C	1.0	1.0	-	$5.2 \times 10^{-6}$
D	1.0	0.5	-	$2.1 \times 10^{-4}$
E	0.5	1.0	-	$2.2 \times 10^{-5}$
F	0.5	2.0	H	$4.0 \times 10^{-7}$
G	0.5	2.0	H	$6.7 \times 10^{-6}$
H	0.5	1.0	-	$1.7 \times 10^{-5}$
I	0.5	1.0	-	$7.5 \times 10^{-6}$
J	1.0	0.5	-	$4.1 \times 10^{-6}$

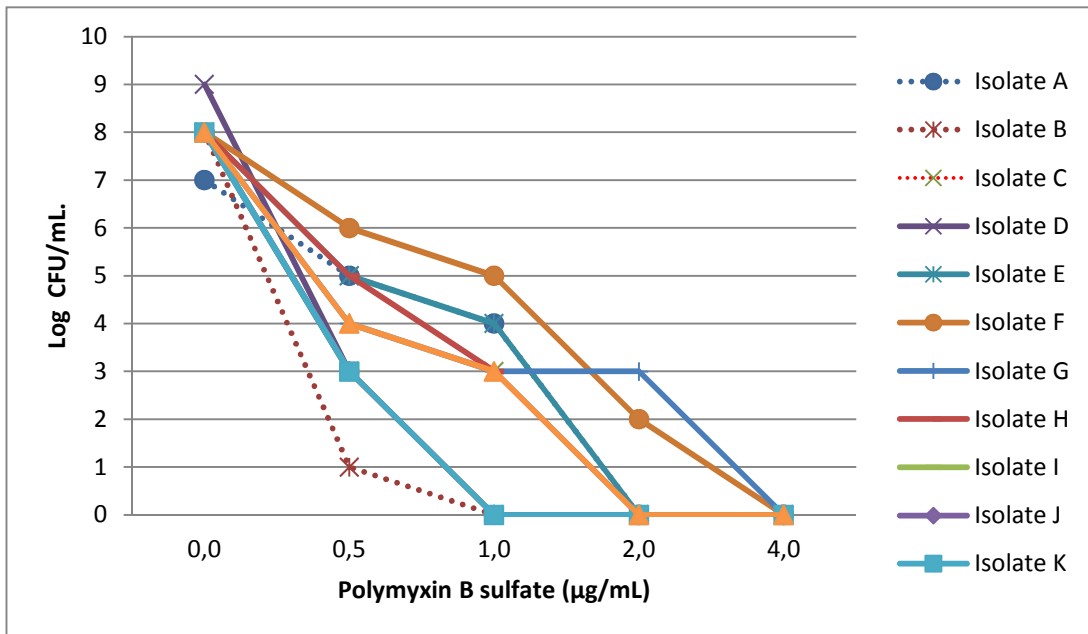
K	1.0	0.5	-	$1.1 \times 10^{-5}$
L	0.5	1.0	-	$5.0 \times 10^{-6}$
Group R				
M	0.25	4.0	HR	$2.9 \times 10^{-5}$
N	0.25	1.0	H	$4.0 \times 10^{-5}$
O	0.5	2.0	H	$2.6 \times 10^{-4}$
P	0.5	2.0	H	$2.2 \times 10^{-5}$
Q	1.0	2.0	-	$1.5 \times 10^{-5}$
R	0.5	1.0	-	$3.0 \times 10^{-5}$
S	0.5	0.5	-	$4.1 \times 10^{-5}$
T	0.5	2.0	H	$2.0 \times 10^{-7}$
U	0.5	1.0	-	$5.0 \times 10^{-6}$
V	0.5	2.0	H	$5.3 \times 10^{-6}$
X	0.5	2.0	H	$8.0 \times 10^{-6}$
Z	2.0	2.0	-	$9.0 \times 10^{-6}$

H, isolates with heterogeneous subpopulations to polymyxin B; HR, isolate heteroresistant to polymyxin B

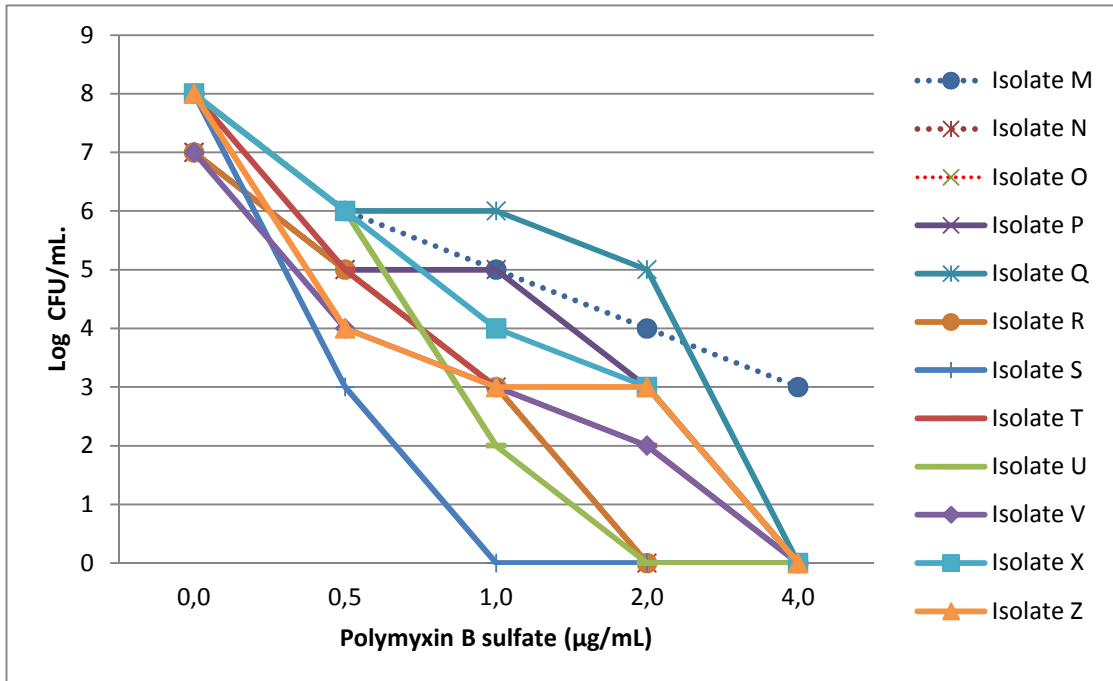
MIC, minimum inhibitory concentration; PMB, polymyxin B; PAP, population analysis profile.



**FIGURE 1. Population analysis profile for group S (carbapenem-sensitive isolates).**



**FIGURE 2. Population analysis profile for group R (carbapenem-resistant isolates).**



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A heteroresistência é um fenótipo de resistência, conhecido como o crescimento de subpopulações resistentes dentro de uma população sensível ao antimicrobiano. Estas subpopulações têm sido investigadas na literatura, com diferentes microrganismos e antibióticos. Porém este é nosso maior conhecimento sobre heteroresistência a polimixina B em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados de nossas pesquisas revelaram uma baixa presença de heteroresistência em isolados de *P. aeruginosa*, entretanto, vários isolados apresentaram crescimento de subpopulações heterogêneas às originais.

Não associamos nenhum mecanismo de resistência à presença de subpopulações heteroresistentes/heterogêneas.

Mais estudos deveriam ser realizados para completo entendimento, do impacto clínico destas amostras heterogêneas e heteroresistentes. Por não ser realizada a investigação do Perfil de Análise Populacional (PAP) na rotina

microbiológica, a heteroresistência pode ser um fenômeno de prevalência subestimada.

Como prospecções futuras, realizaremos mais investigações sobre a heteroresistência em isolados de *P. aeruginosa*. A relação do perfil clonal também será realizada para investigação da presença ou ausência de clones heteroresistentes. Buscaremos pesquisar outros mecanismos de resistência de *P. aeruginosa* para investigarmos se há correlação com a heteroresistência.