

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE RESISTÊNCIA INDUZIDA À POLIMIXINA EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Gabriella Candido (PIBIC/CNPq/UEM), Paula Assis Queiroz, Katiany Caleffi-Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro, Rosilene Fressatti Cardoso, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: vlidsiqueira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6

Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0

Palavras-chave: polimixina B, heterorresistência, *Klebsiella pneumoniae*

Resumo:

O uso global e acelerado das polimixinas em ambientes clínicos e produção animal têm aumentado as taxas de resistência a este antimicrobiano. Um dos fenótipos de resistência às polimixinas é denominado mecanismo adaptativo, no qual a bactéria, inicialmente sensível, desenvolve resistência após à exposição em concentrações crescentes de polimixinas. A utilização do antimicrobiano em doses não suficientes para erradicação do patógeno pode contribuir para o surgimento deste fenótipo (heterorresistência), porém sua estabilidade é variável. O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade de fenótipos heterorresistentes à polimixina B em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase do tipo KPC, inicialmente sensíveis à polimixina. A indução da resistência foi realizada em culturas sob aumento da concentração de sulfato de polimixina B (0,5 µg/ml a 64 µg/ml). A concentração inibitória mínima (CIM) foi confirmada pelo método microdiluição em caldo e isolados heterorresistentes foram submetidos ao subcultivo em dias consecutivos em ágar na ausência de polimixina B, a fim de verificar a estabilidade do fenótipo de resistência. Quatro isolados selecionados apresentaram CIM inicial à polimixina de 0,5 µg/mL. Após a indução, três isolados apresentaram um fenótipo heterorresistente com CIM igual a 64 µg/ml e um isolado CIM >128 µg/ml. Nenhum dos isolados testados reverteu seu perfil de resistência após o cultivo na ausência da droga, porém, todos apresentaram uma queda de uma vez na CIM após o 4º ou 5º repique. Assim, este estudo mostrou a presença de heteroresistência em isolados de *K. pneumoniae* e a estabilidade deste fenótipo após a ausência de pressão seletiva.

Introdução

As polimixinas são antimicrobianos conhecidos desde a década de 40. Tal como outros peptídios antimicrobianos, as polimixinas interagem com o

lípidio A presente na porção de lipopolissacárideos (LPS) da membrana de bactérias gram-negativas (FALAGAS, 2010).

Atualmente, as taxas de infecção causada por bactérias Gram negativas resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados comumente na clínica tem aumentado com grande rapidez, restringindo cada vez mais as opções terapêuticas (FALAGAS 2010). Assim, a rápida disseminação de gram-negativos multidroga resistentes (GN-MDR), especialmente isolados produtores de carbapenemases, acelerou o uso global das polimixinas em ambientes clínicos e produção animal, o que inevitavelmente aumentou as taxas de resistência às polimixinas. A resistência às polimixinas está associada à exposição a polimixinas e, especialmente, à dosagem terapêutica sub-ótima (FALAGAS, 2010). O mecanismo de resistência a polimixina inclui modificações da estrutura da membrana externa bacteriana, em especial o LPS. A modificação do LPS é principalmente mediada pelos sistemas reguladores de dois componentes PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ. Estes mecanismos existem com algumas diferenças em muitas espécies de bactérias gram-negativas (JAYOL, 2014).

Os mecanismos de resistência às polimixinas não estão completamente elucidados até o momento. Em geral, são observados dois fenótipos de resistência, o primeiro, denominado resistência natural, provavelmente resultante de mutação no genoma bacteriano e o segundo fenótipo de resistência é denominado mecanismo adaptativo, no qual a bactéria, inicialmente sensível, desenvolve resistência às polimixinas após à exposição em concentrações crescentes da droga (MOSKOWITZ, 2012).

A heterorresistência é um fenômeno onde subpopulações de bactérias aparentemente isogênicas exibem diferentes perfis de suscetibilidade a um determinado antibiótico, e esta pode ser intrínseca ou adquirida/induzida (HALABY, 2016). A heterorresistência pode ter um impacto no resultado da infecção clínica, particularmente porque sua detecção pode ser difícil pelo teste de sensibilidade antimicrobiana na rotina de um laboratório.

Desta forma, a utilização do antimicrobiano em doses não suficientes para erradicação do patógeno pode contribuir para o surgimento do fenótipo adaptativo de resistência às polimixinas, porém a estabilidade desse fenótipo resistente pode variar de acordo com a exposição ou não à polimixina e pode variar de acordo com a espécie bacteriana (MOSKOWITZ, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade do mecanismo de resistência induzida à polimixina B em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase do tipo KPC, inicialmente sensíveis à polimixina, através da indução de um fenótipo resistente a esse antimicrobiano.

Materiais e métodos

Foram selecionados quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase do tipo KPC sensíveis à polimixina B, identificados no Setor de Bacteriologia Clínica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme recomendado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foi utilizado Sulfato de Polimixina B (Inlab) em diluições seriadas de 0,250 a 128 g/ml. A interpretação foi realizada segundo pontos de corte estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (<http://www.eucast.org/>). Os isolados com $CIM \leq 2 \mu\text{g/ml}$ foram categorizados como susceptíveis, e aqueles com $CIM > 2 \mu\text{g/ml}$ foram considerados resistentes.

A indução de um fenótipo heterorresistente (mutante) a partir de isolados de *K. pneumoniae* foi realizada por culturas em meio sólido, utilizando-se ágar Muller Hinton (MHA), sob aumento da concentração de sulfato de polimixina B (0,5µg/ml a 64µg/ml) em dias consecutivos. A concentração inibitória mínima (CIM) de colônias presentes em placas com concentrações maiores que 2 µg/ml foi confirmada pelo método microdiluição em caldo e o isolado heterorresistente foi submetido ao subcultivo em dias consecutivos em MHA na ausência de polimixina B, a fim de verificar a estabilidade do fenótipo de resistência induzida na presença e ausência da droga. A cada subcultivo o valor da CIM foi determinado novamente pelo método de microdiluição em caldo.

Resultados e Discussão

Os quatro isolados selecionados de *K. pneumoniae* apresentaram CIM inicial à polimixina de 0,5 µg/mL. Os isolados foram cultivados em MHA, sob aumento da concentração de sulfato de polimixina B de 0,5µg/ml a 64µg/ml, e após repiques foram selecionados fenótipos heterorresistentes. Os isolados 1, 2 e 3 apresentaram um fenótipo heterorresistente com CIM igual a 64µg/ml. O isolado 4 apresentou um fenótipo heterorresistente com CIM >128µg/ml. Estes fenótipos selecionados com resistência induzida à polimixina B foram submetidos ao cultivo na ausência do antimicrobiano para verificar a estabilidade da resistência desenvolvida. Nenhum dos isolados testados reverteu seu perfil de resistência após o cultivo na ausência da droga, mostrando a estabilidade do novo fenótipo de resistência. Porém, todos os isolados apresentaram uma queda de uma vez na CIM. Os isolados 1,2 e 4 tiveram a CIM reduzida a partir do 4º repique, e o isolado 3 teve a CIM reduzida a partir do 5º repique, após a ausência de pressão seletiva exercida pela polimixina B (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) à polimixina B de quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* em sete dias de repiques consecutivos na ausência da droga, após a indução de resistência.

	CIM						
	1º repique	2º repique	3º repique	4º repique	5º repique	6º repique	7º repique
Isolado 1	64µg/mL	64µg/mL	64µg/mL	32µg/mL	32µg/mL	32µg/mL	32µg/mL
Isolado 2	64µg/mL	64µg/mL	64µg/mL	32µg/mL	32µg/mL	32µg/mL	32µg/mL

Isolado 3	64µg/mL	64µg/mL	64µg/mL	64µg/mL	32µg/mL	32µg/mL	32µg/mL
Isolado 4	>128µg/mL	>128µg/mL	>128µg/mL	128µg/mL	128µg/mL	128µg/mL	128µg/mL

Ponto de corte estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Polimixina B (S ≤ 2; R > 2). Abreviações: CIM: concentração inibitória mínima. R: resistente. S: sensível. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. NEG: negativo.

A heterorresistência é um fenômeno onde subpopulações de bactérias aparentemente isogênicas exibem diferentes perfis de suscetibilidade a um determinado antibiótico, e esta pode ser intrínseca ou adquirida/induzida (HALABY, 2016). Neste estudo analisamos a heterorresistência induzida após exposição à polimixina B em 4 isolados de *K. pneumoniae*.

Embora heterorresistência tenha sido descrita anteriormente para *K. pneumoniae* (HALABY, 2016), dados sobre a base molecular da resistência à polimixina nesta espécie são escassos. Neste estudo não avaliamos mecanismos de resistência à polimixina, porém mostramos que os isolados heterorresistentes apresentaram um fenótipo estável. Estudos mostram que mutações nos genes que codificam o sistema de dois componentes PhoPQ e a inativação do gene mgrB são vias importantes pelas quais *K. pneumoniae* pode adquirir resistência à polimixina (JAYOL, 2014).

Conclusões

O presente estudo mostrou a presença de heteroresistência à polimixina B em isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e a estabilidade deste fenótipo após a ausência de pressão seletiva exercida pela polimixina B. Embora existam diversos mecanismos que possam levar à resistência à polimixina, ressaltamos a importância de monitorar a existência de subpopulações resistentes em testes de susceptibilidade diagnóstica em isolados de *K. pneumoniae*.

Referências

FALAGAS, M. E. et al. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resist Updat**, v.13, n.4-5, p. 132-8, 2010.

HALABY, T. et al. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01344-16, 2016.

JAYOL, A. et al. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4762-6, Aug 2014.

MOSKOWITZ, S.M. et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1019-1030, 2012.