

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação da heteroresistência a carbapenêmicos em isolados do
complexo *Enterobacter cloacae*.**

Ane Elise Bruhn da Silva

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação da heteroresistência a carbapenêmicos em isolados do
complexo *Enterobacter cloacae*.**

Dissertação apresentada por **Ane Elise
Bruhn da Silva** para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Mestrado Acadêmico e aprovada em 27 de março de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

1- Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

2- Profa. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

3- Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Ane Elise Bruhn da
Avaliação da heteroresistência a carbapenêmicos em
isolados do complexo *Enterobacter cloacae*. / Ane
Elise Bruhn da Silva. -- 2015.
61 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Heteroresistência. 2. Carbapenêmicos. 3.
Complexo *Enterobacter cloacae*. 4. OXA-370. I. Barth,
Afonso Luis, orient. II. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) e a mestranda recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento primeiramente a Deus pelos milagres diários.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth pela oportunidade, confiança depositada e tão necessária orientação.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial do Centro de Pesquisa Experimental e do Setor de Esterilização do Laboratório de Patologia Clínica, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS em especial a Carolina Nodari e Dra. Andreza Martins por disponibilizarem seu tempo e conhecimento, a Leandro Reus Rodrigues Perez pela amizade, as Bolsistas de Iniciação Científica pela ajuda prestada e todos os demais por tornarem tão agradável o convívio neste tempo que passamos juntos.

A CAPES pela bolsa de estudo e a FIPE – HCPA pelo financiamento do projeto que tornaram o trabalho financeiramente possível.

O meu muito, muito obrigada a minha família em especial a meu pai Karl Heinz Hubert Bruhn, minha irmã Mirian Beatriz Lima Bruhn e meu marido Paulo Roberto da Silva, pela paciência e por me compreenderem e desculpar em todos os momentos de ausência. Ao Paulo, ainda, pelo carinho, incentivo e companheirismo que tornaram sustentável esta trajetória.

Aos meus filhos que, embora sem compreenderem a dimensão do esforço, foram essenciais para me dar força para continuar.

A todos que de alguma forma ajudaram para que eu pudesse realizar esta dissertação.

Muito Obrigada!

RESUMO

Os isolados do complexo *Enterobacter cloacae* estão entre os principais patógenos causadores de infecções hospitalares. Embora os carbapenêmicos sejam considerados a última opção terapêutica no tratamento de infecções graves por *Enterobacter* spp, existem evidências indicando o aumento da resistência deste gênero aos carbapenêmicos. Esta resistência é normalmente mediada pela hidrólise dos carbapenêmicos por β -lactamases (carbapenemases). A resistência aos carbapenêmicos se apresenta de forma homogênea numa população bacteriana, no entanto, eventualmente a resistência pode ocorrer em apenas parte da população. Heteroresistência pode ser definida como a expressão de resistência de uma subpopulação dentro de uma população considerada sensível em testes de susceptibilidade *in vitro* e pode ser considerada um estágio precursor, o qual pode ou não levar a emergência de uma população homogeneamente resistente. A não detecção destas subpopulações resistentes pode levar ao fracasso no tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a heteroresistência aos carbapenêmicos em isolados do complexo *Enterobacter cloacae*. Trinta e um isolados foram selecionados de acordo com seu perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem sensíveis e ertapenem resistente) e a presença de OXA-370 (5 positivas para *bla*_{OXA-370}). A heteroresistência foi avaliada por análise de perfil populacional (PAP). Isolados com subpopulações que apresentaram crescimento em concentrações de carbapenêmicos $\geq 4\mu\text{g/ml}$ foram considerados heteroresistentes e isolados contendo subpopulações que cresceram em concentrações de carbapenêmicos pelo menos duas vezes maior do que o MIC original, mas $< 4\mu\text{g/ml}$ foram considerados heterogêneos. A estabilidade da heteroresistência foi determinada por sub-cultivo sete dias em meio isento de antibiótico. Um total de 6 (19,4%) isolados apresentaram subpopulações heteroresistentes e 15 (48,4%) subpopulações heterogêneas ao imipenem. Em relação ao meropenem foi encontrado apenas 1 (3,2%) isolado heteroresistente e 5 (16,13%) isolados com subpopulações heterogêneas. Todos os isolados positivos para *bla*_{OXA-370} foram classificados como heteroresistentes ou heterogêneos ao imipenem. Apenas 2/21 (9,5%) e 2/6 (33,3%) subpopulações heterogêneas/heteroresistentes para imipenem e

meropenem, respectivamente, mantiveram os mesmos MICs após sete dias de sub-cultivo em meio isento de antibiótico. Nossos resultados indicam que subpopulações heterogêneas/heteroresistentes ao imipenem são comuns entre isolados do complexo *Enterobacter cloacae* (21/31; 67,7%). Os isolados de OXA-370 foram classificados como heterogêneo/heteroresistente e, portanto, a presença de *bla*_{OXA-370} pode estar associada ao aumento de heteroresistência a imipenem. Já a estabilidade da heteroresistência e heterogeneidade aos carbapenêmicos demonstrou-se baixa.

Palavras- chaves: Heteroresistência, carbapenêmicos, complexo *Enterobacter cloacae*.

ABSTRACT

Enterobacter cloacae complex isolates are major pathogens in hospital infections. Although carbapenems are considered the last resort in the treatment of severe infections caused by *Enterobacter* spp, there are several reports indicating increase of resistance to carbapenems among isolates of this genus. This resistance is usually mediated by hydrolysis of carbapenems by β -lactamases (carbapenemases). Carbapenem-resistance is usually a homogeneous feature in a bacterial population but, eventually, the resistance may occur in only a small proportion of the population. Heteroresistance can be defined as resistance to certain antibiotics expressed by a subset of a microbial population that is generally considered to be susceptible to these antibiotics according to traditional *in vitro* susceptibility testing. Lack to detect heteroresistance may lead to the therapeutic failure. The aim of this study was to evaluate the heteroresistance to carbapenems among *Enterobacter cloacae* complex isolates. Thirty-one isolates of *Enterobacter cloacae* complex were selected according to their susceptibility profile as follow: resistance to ertapenem and susceptibility to imipenem and meropenem. Among these, five isolates presented the *bla*_{OXA-370} gene. Heteroresistance was evaluated by population analysis profile (PAP). Isolates that grew at concentrations $\geq 4\mu\text{g/mL}$ of carbapenem were considered heteroresistant, while those that grew at concentration with at least two dilutions higher than the original MIC, but $< 4\mu\text{g/mL}$ were considered heterogeneous. Heteroresistance stability was determined after seven day sub-culture in antibiotic-free medium. A total of 6 (19.4%) isolates presented heteroresistant subpopulations and 15 (48.4%) heterogeneous subpopulations to imipenem. Only 1 (3.2%) isolate was heteroresistant and 5 (16.1%) heterogeneous to meropenem. All positive isolates for *bla*_{OXA-370} were classified as heteroresistant or heterogeneous to imipenem. Only 2/21 (9.5%) and 2/6 (33.3%) heterogeneous/heteroresistant subpopulations to imipenem and meropenem, respectively, kept the same MIC of the subpopulation after seven days in antibiotic free medium. Our results indicate that heterogeneous/heteroresistant subpopulations were common among *Enterobacter cloacae* complex (21/31 - 67.7%) to imipenem and less common to meropenem. Noteworthy, that all OXA-370 producing isolates were

classified as heterogeneous/heteroresistant. Therefore, the presence of *bla*_{OXA-370} may be associated with increase heteroresistance to imipenem. The stability of heteroresistance was low in antibiotic-free medium after seven days.

Keywords: Heteroresistance, carbapenems, *Enterobacter cloacae* complex.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	17
2. OBJETIVOS:	
2.1. Objetivo Geral:.....	19
2.2. Objetivos Específicos:.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA:	
3.1. Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> :.....	21
3.2. Resistência as cefalosporinas:.....	22
3.4. Resistência aos carbapenêmicos:.....	23
3.5. Heterorresistência:.....	27
4. ARTIGO CIENTÍFICO:.....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	57

1. INTRODUÇÃO:

Nas últimas décadas o gênero *Enterobacter* tornou-se mais importante clinicamente e tem emergido como patógeno hospitalar, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde já figura como um dos principais responsáveis por infecções respiratórias graves (MARCHAIM et al., 2008). As espécies pertencentes ao complexo *Enterobacter cloacae* são as mais frequentemente isoladas em amostras clínicas e sua capacidade de adquirir determinantes de resistência torna-as micro-organismos mais preocupantes atualmente (MEZZATESTA et al., 2012).

Carbapenêmicos são os mais potentes antibióticos β -lactâmicos e são considerados como sendo o último recurso para tratamento de infecções graves causadas por espécies de *Enterobacter*. Porém, a crescente taxa de resistência aos carbapenêmicos tem dificultado o tratamento das infecções nosocomiais (PAPP-WALLACE et al., 2011). A resistência aos carbapenêmicos pode envolver vários mecanismos diferentes, combinados ou não, tais como: alteração da permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo associados com a hiperprodução de AmpC ou β -lactamase de espectro estendido (ESBL), ou ainda a produção de β -lactamases que hidrolisam os carbapenêmicos (carbapenemases) (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A resistência aos carbapenêmicos muitas vezes não se apresenta de forma homogênea. Isolados que se apresentam como susceptíveis em testes de sensibilidade de rotina podem tornar-se resistentes durante o tratamento com estes medicamentos, devido a heteroresistência (GORDON; WAREHAM, 2009). Heteroresistência pode ser definida como a resistência a certos antibióticos expressa por um subconjunto de uma população microbiana que é considerado fenotipicamente sensível nos testes tradicionais *in-vitro* e pode ser considerada como uma etapa prévia à resistência homogênea (FALAGAS et al., 2008).

Este fenômeno é reconhecido desde 1947, foi extensamente estudado em Gram positivos e a sua relevância clínica em Gram negativos tem sido considerada devido a possível relação com falhas terapêuticas em tratamentos de infecções graves (EL HALFAWY; VALVANO, 2015). A heteroresistência a carbapenêmicos em enterobactérias foi relatada em *Klebsiella pneumoniae*

(TATO et al., 2010;. POURNARAS et al., 2010; NODARI et al., 2015), *Providencia rettgeri* (ZAVASCKI et al., 2014), e isolados de *Enterobacter aerogenes* (GORDON; WAREHAM, 2009).

Os mecanismos exatos que envolvem a heteroresistência e suas bases genéticas ainda não foram esclarecidos. Estudos têm relacionado a produção de carbapenemases a uma maior prevalência de populações heterogêneas em *Klebsiella pneumoniae* (TATO et al., 2010; POURNARAS et al., 2010; NODARI et al., 2014), demonstrando um viés a ser explorado. Porém, não há ainda uma compreensão completa do significado clínico da heteroresistência e do seu papel na adaptação bacteriana à presença do antibiótico (WANG et al., 2014). A não detecção de subpopulações resistentes pode levar ao fracasso do tratamento e à disseminação de cepas resistentes (FALAGAS et al., 2008).

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral:

Investigar a heteroresistência ao imipenem e meropenem em isolados clínicos do complexo *Enterobacter cloacae*.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar a ocorrência de populações heterogêneas ao imipenem e meropenem em isolados clínicos do complexo *Enterobacter cloacae*, resistentes ao ertapenem;
- Determinar a ocorrência de populações heteroresistentes ao imipenem e meropenem em isolados clínicos do complexo *E. cloacae*, resistentes ao ertapenem;
- Avaliar a ocorrência de populações heteroresistentes ao imipenem e meropenem em isolados clínicos do complexo *E. cloacae*, produtores de OXA-370

3. REVISÃO DA LITERATURA:

3.1. Complexo *Enterobacter cloacae*:

Bactérias do Gênero *Enterobacter* são bacilos Gram negativos anaeróbios facultativos pertencentes à Família Enterobacteriaceae (enterobactérias) amplamente encontrados na natureza e na microbiota intestinal de homens e animais. Até 1970 era considerado um comensal típico e nenhuma evidência sugeria que seu significado clínico se estenderia além de infecções oportunistas. Nas últimas décadas, o *Enterobacter* spp. assumiu significado clínico mais importante e têm emergido como patógeno hospitalar de grande relevância (MEZZATESTA et al., 2012).

O gênero *Enterobacter* foi primeiramente descrito por Jordan (1890) como *Bacillus cloacae*, posteriormente como *Aerobacter cloacae* em 1923 por Bergey e finalmente como *Enterobacter cloacae* por Hormaeche e Edwards em 1960. Sofreu várias modificações taxonômicas ao longo dos últimos 50 anos. Atualmente, existem 22 espécies do gênero *Enterobacter*. Seis destas espécies estão agrupadas no chamado Complexo *Enterobacter cloacae* devido sua similaridade genômica (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* e *E. nimipressuralis*), sendo *E. cloacae* e *E. hormaechei* as mais comuns em amostras clínicas. (BRADY et al., 2012).

Como patógenos humanos causam infecções em diferentes sítios como: cistites, pielonefrites, pneumonia, peritonites, meningites, septicemia, entre outros. (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Estão entre as causas mais comuns de infecções causadas por Gram negativos associadas aos cuidados de saúde em pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI).

De acordo com o relatório da Rede Nacional de Segurança de Saúde (NHSN) junto ao Centro de Controle e Prevenção às Doenças (CDC-USA), nos anos de 2009 – 2010 houveram 69.475 infecções hospitalares ocasionadas por 81.139 patógenos nos Estados Unidos. O *Enterobacter* spp. consta entre os oito patógenos responsáveis por 80% das ocorrências notificadas, sendo responsável por 5,5% (3.821) do total de infecções hospitalares relatadas.

Estas infecções foram em sua maioria pneumonias associadas à ventilação mecânica, seguidas de bacteremias associadas a cateteres centrais. Dos isolados de *Enterobacter* spp. relatados, aproximadamente 30% mostraram-se resistentes as cefalosporinas e cerca de 3% resistentes a carbapenêmicos (SIEVERT et al., 2013).

No Brasil, de acordo com o Boletim Informativo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano de 2012, foram notificados 939 (4,9%), casos de infecção primária de corrente sanguínea em adultos internados nas UTIs cujo agente etiológico foi o *Enterobacter* spp.. Destes 32,9%, foram resistentes a cefalosporinas e 11,4%, foram resistentes a cefalosporinas e carbapenêmicos concomitantemente (ANVISA, 2014).

3.2. Resistência as cefalosporinas:

As cefalosporinas são antimicrobianos β -lactâmicos com amplo espectro de atividade, comprovada eficiência e perfil de segurança favorável, tornando-se a classe de antimicrobianos mais comumente prescrita. A partir das primeiras cefalosporinas (consideradas de primeira geração) foram feitas modificações a fim de ampliar suas propriedades antimicrobianas contra Gram negativos. Atualmente existem quatro gerações reconhecidas de cefalosporinas (BASSETTI, et al., 2013).

A resistência as cefalosporinas é principalmente mediada pela produção de β -lactamases. Isolados do complexo *Enterobacter cloacae* são intrinsecamente resistentes as cefalosporinas de primeira geração e cefoxitina devido à produção constitutiva de AmpC. Estes micro-organismos são capazes de superproduzir AmpC por desrepressão de um gene cromossômico, ou através da aquisição de um gene transferível de plasmídeos ou outros elementos móveis. A AmpC mediada por plasmídeos confere resistência as cefalosporinas de terceira geração e não são inibidas por inibidores comuns de β -lactamases como o clavulanato (MEZZATESTA et al., 2012).

Embora, a resistência a cefalosporinas em isolados de *Enterobacter cloacae* seja tradicionalmente caracterizada pela produção de AmpC, um número crescente de isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) têm sido observados em todo o mundo e tem sido

reconhecido como importante mecanismo de resistência (DOUMITH et al., 2009). Enquanto SHV-12 foi demonstrada como predominante em *Enterobacter cloacae* em Taiwan (YANG et al., 2012), na China as ESBLs mais comumente encontradas foram CTX-M e TEM (DAI et al., 2013). Nogueira e col. (2014) relataram que no período de 2004 a 2008 em um Hospital Universitário no Paraná - Brasil, a frequência de ESBL entre *Enterobacter* spp. isolados de pacientes com bacteremia foi de 20%. O tipo predominante de ESBL foi CTX-M, com menor participação de outros tipos, tais como SHV e PER.

Embora a produção de β -lactamases seja o principal mecanismo de resistência a cefalosporinas, também têm sido relatados outros, tais como modificações no local alvo (por exemplo, nas proteínas de ligação à penicilina), alteração de porinas ou bombas de efluxo (MARCHAIM et al., 2008).

A principal consequência da resistência às cefalosporinas foi o aumento no uso de carbapenêmicos para tratamento de infecções graves causadas por isolados de *Enterobacter* spp..

3.3. Resistência aos carbapenêmicos:

Carbapenêmicos desempenham um papel extremamente importante no arsenal de antibióticos. Dentre os antimicrobianos β -lactâmicos, os carbapenêmicos são os mais potentes e de maior espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em 1985, o imipenem tornou-se o primeiro carbapenêmico disponível para o tratamento de infecções bacterianas graves. A partir dele outros compostos mais estáveis como o ertapenem ou com espectro mais amplo de atividade como o meropenem e doripenem foram desenvolvidos. Eles são usados como "agentes de última linha" nas infecções graves ou que são causadas por bactérias resistentes. Infelizmente, a crescente emergência de patógenos resistentes ameaça seriamente esta classe de medicamentos (PAPP-WALLACE et al., 2011).

A resistência a carbapenêmicos pode envolver vários mecanismos diferentes, combinados ou não: modificações da permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo, associados com a hiperprodução de

AmpC ou ESBL, ou ainda, produção de β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos (carbapenemases) (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A resistência a carbapenêmicos foi primeiramente observada em isolados de *Enterobacter* spp. (aproximadamente 1% de amostras) por hiperexpressão de AmpC cromossomal ou ESBL associado a alterações de porinas OmpC ou OmpF (DOUMITH et al., 2009). A produção de ESBL em combinação com a diminuição na permeabilidade da membrana foi observada em várias enterobactérias como: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp., nas quais os genes codificadores de ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}) estão localizados em plasmídios (GARCIA FERNANDEZ et al., 2010). Semelhantemente, a hiperexpressão de AcrA, um componente de bomba de efluxo, foi descrito como responsável por resistência a imipenem em isolados de *Enterobacter aerogenes* (BORNET et al., 2003). Porém é a produção de carbapenemases que denota mais preocupação sobre sua disseminação.

Carbapenemases encontradas em enterobactérias podem ser do tipo metalo- β -lactamase (classe B de Ambler), oxacilinases (classe D de Ambler) ou β -lactamases de classe A de Ambler (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

As quatro principais carbapenemases da classe A de Ambler conhecidas são as enzimas NmcA/IMI, SME, GES e KPC. A primeira carbapenemase reportada foi do tipo NmcA cromossômica em isolado de *Enterobacter cloacae* em 1994 (NAAS; NORDMAN, 1994). Todas as quatro enzimas hidrolisam uma grande variedade de β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam, por um mecanismo hidrolítico que envolve um sítio ativo que contém o aminoácido serina na posição 70. Esta atividade hidrolítica é inibida *in vitro* pelo ácido clavulânico ou pelo tazobactam (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012), sendo que a KPC é inibida pelos ácido fenilborônico.

As β -lactamases classe B de Ambler (metalo- β -lactamases) exibem um amplo espectro de capacidade hidrolítica incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, com exceção do aztreonam. A sua atividade não é inibida pelos inibidores de β -lactamases comercialmente disponíveis (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam). A hidrólise é dependente da interação do anel β -lactâmico com íons Zn^{+2} no sítio ativo da enzima, explicando a

inibição da sua atividade por EDTA, um quelante de cátions divalentes. Desde 1990, um aumento dramático na aquisição de genes de metalo- β -lactamases (MBL) transferíveis estão sendo descritos em enterobactérias. Os tipos mais comuns de MBLs adquiridos identificados em enterobactérias incluem os tipos IMP e VIM, conjuntamente com NDM que é um tipo novo e emergente de MBL (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

Beta-lactamases da classe D de Ambler, também chamadas de oxacilinasas constam entre as primeiras β -lactamases detectadas. Mediadas por plasmídeos, limitavam-se a hidrólise de penicilinas e cefalosporinas e eram mais comuns em isolados de bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, como o *Acinetobacter* spp. Após a década de 1980 com a disseminação de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, foram sendo identificadas inúmeras novas oxacilinasas, algumas plasmidiais como as OXA-23, OXA-40, e OXA-58 e outras cromossomais como a OXA-51 (EVANS et al., 2014). Atualmente incluem em torno de 400 enzimas, dentre as quais apenas algumas variantes possuem atividade como carbapenemases (NORDMANN; POIREL, 2014). São distribuídas em 12 grupos com base na sua identidade de sequência de aminoácidos (OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 e OXA-134, OXA-143, OXA-211, OXA- 213 OXA-214, OXA-229 e OXA-235), em sua maioria estão presentes em *Acinetobacter* spp. com exceção da OXA-48, que é mais frequente em enterobactérias (ANTUNES et al., 2014; EVANS et al., 2014).

Em 2001 foi isolada em Istambul, na Turquia a primeira cepa de uma enterobactéria (*Klebsiella pneumoniae*) multirresistente produtora de uma β -lactamase OXA-48. Após seu surgimento houve uma rápida propagação entre enterobactérias nos países do norte da África, leste e sul do Mar Mediterrâneo e Europa, onde se localizam os principais reservatórios e são frequentes os relatos de surtos envolvendo cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* produtoras de OXA-48 (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Já foram identificadas 10 variantes da OXA-48 que diferem entre si em um pequeno número de substituições de aminoácidos e estão difundidas em várias regiões geográficas. São variantes da OXA-48: OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247

(MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014) e a recentemente descrita OXA-370 (SAMPAIO et al., 2014).

No Brasil, em Porto Alegre foi relatado o primeiro isolado de *Enterobacter hormaechei* produtor de uma variante de OXA-48 identificada como OXA-370, que difere da OXA-48 por duas substituições de aminoácidos (SAMPAIO et al., 2014).

Em geral a OXA-48 não é inibida pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Embora possua capacidade hidrolítica alta para penicilina, hidrolisa carbapenêmicos em baixo nível e fracamente cefalosporinas de espectro estendido como ceftazidima e cefepime. Possui uma eficiência catalítica mais elevada para imipenem do que ao meropenem (EVANS et al., 2014).

Após análises cinéticas comparativas entre cinco diferentes variantes da OXA-48 (OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 e OXA-232), foi demonstrado que com exceção da OXA-163, que difere da OXA-48 por demonstrar maior atividade contra cefalosporinas de espectro estendido, sendo parcialmente inibida por ácido clavulânico, as variantes OXA-162, OXA-181, OXA-204 e OXA-232 possuem atividade bastante semelhante a OXA-48 (OUESLATI; NORDMANN; POIREL, 2015). Até o momento, não foi estabelecida a capacidade hidrolítica da OXA-370 para os carbapenêmicos mas, provavelmente, é similar a OXA-48 (SAMPAIO et al., 2014).

As consequências clínicas relacionadas com a disseminação dos produtores de OXA-48, e suas variantes, podem ser muito importantes, pois na rotina laboratorial, muitos destes isolados são classificados como sensíveis aos carbapenêmicos, o que dificulta seu reconhecimento e detecção, porém sua associação com a produção de cefalosporinases como ESBL ou AmpC ou a diminuição de permeabilidade da membrana aumentam os níveis de resistência aos carbapenêmicos (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

Métodos rápidos para a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos desempenham um papel importante no sentido de garantir o uso adequado e apropriado de agentes antimicrobianos. Da mesma forma a administração imediata da terapia antimicrobiana eficaz é fundamental para melhorar o prognóstico do tratamento de uma infecção grave (GORDON; WAREHAM, 2009). Contudo, a resistência de baixo nível e mesmo a

sensibilidade a carbapenêmicos foram observadas para os produtores de qualquer tipo de carbapenemases. Por exemplo, cepas de *K. pneumoniae* podem aparecer como sensíveis a carbapenêmicos nos testes de disco difusão em ágar, microdiluição em placa e nos sistemas automatizados, utilizando os pontos de corte estabelecidos, mesmo sendo produtora de carbapenemase (GORDON; WAREHAM, 2009; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

Os sistemas automatizados não detectam com precisão a resistência a carbapenêmicos, mediada por enzima, quando é expressa em níveis baixos, e os micro-organismos produtores de carbapenemases podem até parecer totalmente sensíveis a estes agentes (TATO et al., 2010). Adicionalmente, resultados reprodutíveis dentro do mesmo método ou entre diferentes métodos, tais como o disco difusão ou gradiente de concentração, nem sempre são obtidos, e produzem discrepâncias na sensibilidade à imipenem e à meropenem em isolados positivos para algumas carbapenemases (POURNARAS et al., 2010).

3.4. Heteroresistência:

A presença de subpopulações bacterianas resistentes em uma população considerada sensível nos testes de susceptibilidade é denominada heteroresistência (FALAGAS et al., 2008).

Primeiramente este fenômeno foi estudado e muito observado em patógenos Gram positivos, mas é encontrado em uma ampla gama de micro-organismos e, frequentemente, em casos de falhas de tratamento (WANG, et al., 2014). Este fenômeno tem sido extensamente estudado frente as mais diversas combinações de micro-organismos e antimicrobianos. A heteroresistência a carbapenêmicos já foi relatada em *Klebsiella pneumoniae* (TATO et al., 2010; POURNARAS et al., 2010; NODARI et al., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* (POURNARAS et al., 2007), *Providencia rettgeri* (ZAVASCKI et al., 2014), *Acinetobacter baumannii* (IKONOMIDES et al. 2009; FERNANDEZ CUENCA et al., 2012) e em isolados de *Enterobacter aerogenes* (GORDON; WAREHAM, 2009).

Vários métodos de detecção e avaliação de populações heteroresistentes foram propostos como: placas de gradiente de concentração

de antibiótico, métodos de disco em ágar, macrodiluição, E-test[®] e análise do perfil populacional (PAP). A maioria destes métodos foram propostos para a pesquisa de cepas heteroresistentes de *Staphylococcus aureus* a vancomicina (hVISA). O método de análise do perfil populacional (PAP) foi inicialmente proposto por Hiramatsu (1997) e posteriormente modificado por Wootton (2001) que incluiu o cálculo da área sob a curva na análise de perfil populacional (PAP-AUC). Este método, então, tornou-se referência para avaliar a sensibilidade e especificidade de alguns dos outros métodos para detecção de heteroresistência (WOOTON et al., 2001).

O método de PAP é considerado o método mais confiável para detectar subpopulações heteroresistentes em bactérias Gram positivas assim como em bactérias Gram negativas. Neste método diluições seriadas de suspensões bacterianas preparadas a partir da diluição 0,5 Mc Farland (10^8 UFC/mL) são submetidas a concentrações crescentes de antimicrobiano e incubadas. O crescimento bacteriano em cada uma destas concentrações é quantificado e analisado em comparação com o crescimento em placas livres do antimicrobiano resultando na frequência das subpopulações resistentes. O PAP pode ser demonstrado através de gráfico em escala logarítmica da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) versus a concentração de antimicrobiano que indica o decaimento no número de UFC em função do aumento da concentração do antibiótico (MELETIS, 2012). Ainda, é possível a comparação entre as concentrações inibitórias mínimas (CIM) inicial da população bacteriana e da subpopulação resistente, a fim de classificar a subpopulação como heteroresistente ou heterogênea. Como não existem critérios padronizados de consenso para isso, essa classificação é baseada em critérios estabelecidos em estudos prévios como o de Hermes e col. (2013).

O PAP é um método trabalhoso e demorado não sendo adequado para laboratórios clínicos de rotina. Como alternativa, o crescimento de colônias resistentes dentro de uma zona clara de inibição no E-test[®] ou no disco difusão podem ser utilizados para fins de triagem (EL- HALFAWY; VALVANO, 2015).

Heteroresistência poderia ser uma forma de evolução natural de resistência aos fármacos, uma vez que proporciona às bactérias uma

oportunidade para explorar a possibilidade de crescimento na presença de antibióticos antes da aquisição de resistência pela maior parte da população microbiana. Assim, a heteroresistência seria considerada uma etapa precursora, que pode ou não levar ao aparecimento de uma população totalmente resistente (FALAGAS et al., 2008).

Não há ainda um entendimento completo sobre o significado clínico de isolados heteroresistentes. Se por um lado o surgimento de cepas resistentes *in vitro* pode não necessariamente ter implicações terapêuticas, por outro lado, subpopulações resistentes podem proliferar prontamente na ausência de competição, gerando assim, uma prevalência maior da “nova” população resistente. As dificuldades para detectar isolados heteroresistentes podem estar contribuindo para subestimar a real dimensão deste fenômeno (FALAGAS et al., 2008; MELETIS, 2012).

Além disso, a base genética da heteroresistência permanece obscura, apesar das tentativas que foram feitas para avaliá-las. Estudos relacionaram mutações no gene *mecA* como responsável pelo aparecimento de subpopulações heteroresistentes de *Staphylococcus aureus* a metilina (RYFFEL et al., 1994; YOSHIDA et al., 2003), da mesma forma que outros relacionaram a produção de carbapenemas por *Klebsiella pneumoniae* a maior incidência de populações heterogêneas (TATO et al., 2010;. POURNARAS et al, 2010; NODARI, et al., 2014), mas o exato mecanismo da heteroresistência e seu papel na adaptação ao estresse com antibiótico ainda não foram totalmente compreendidos (WANG et al., 2014).

Desta forma, a avaliação de heteroresistência é um fator importante para compreender melhor a estratégia de sobrevivência populacional utilizada pelas bactérias em resposta a presença de antimicrobianos e antecipar tendências de resistência a fim de obter uma melhor efetividade clínica da terapia antimicrobiana.

4. ARTIGO CIENTÍFICO:

Artigo submetido à revista *Journal of Medical Microbiology*.

Carbapenems heteroresistance in *Enterobacter cloacae* complex: high prevalence among isolates producing *bla*_{OXA-370}

Ane Elise Bruhn da Silva^{1,3}; Carolina Silva Nodari^{1,3}; Andreza Francisco Martins²; Afonso Luis Barth^{1,3}

¹ Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, HCPA; ² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS – UFRGS; ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

ABSTRACT

Enterobacter cloacae complex isolates are major pathogens in hospital-acquired infections and the resistance to the carbapenems was increased over the last years. However, the carbapenems resistance is not always homogeneous. This phenomenon is called heteroresistance and may be considered a precursor stage to homogeneous resistance. The exact mechanism of heteroresistance, its genetic basis and its role in adaptation to antibiotic stress, have not been fully understood yet. Thus, the aim of this study was to evaluate heteroresistance to imipenem and meropenem in *Enterobacter cloacae* complex isolates producing and not producing OXA-370. Thirty one *Enterobacter cloacae* complex isolates imipenem and meropenem-susceptible and ertapenem-resistant (5 of them positive for *bla*_{OXA-370}) were evaluated by population analysis profile (PAP). Isolates presenting subpopulations that exhibited growth at carbapenem concentrations $\geq 4\mu\text{g/mL}$ were considered heteroresistant. Isolates containing subpopulations that grew at carbapenem concentrations at least two-fold dilution higher than the original MIC but $< 4\mu\text{g/mL}$ were considered heterogeneous. The stability of carbapenems MIC for the subpopulations was determined after seven day sub-culture in antibiotic-free medium. A total of 6 (19.4%) and 15 (48.4%) isolates presented heteroresistant and heterogeneous subpopulations, respectively, to imipenem. However, only 1 (3.2%) and 5 (16.13%) isolates presented heteroresistant and heterogeneous subpopulations, respectively, to meropenem. All positive isolates for *bla*_{OXA-370} were classified as heteroresistant or heterogeneous to imipenem. Our results indicate that heterogeneous/heteroresistant subpopulation to imipenem was common among *Enterobacter cloacae* complex and the presence of *bla*_{OXA-370} may be associated to the increase of heteroresistance.

Keywords: Heteroresistance, carbapenems, *Enterobacter cloacae* complex, OXA-370

INTRODUCTION

The *Enterobacter* genus has increased its clinical significance and has emerged as one of the most common nosocomial pathogens among patients in intensive care units. The species of *Enterobacter cloacae* complex are the most frequently isolates of the genus (Marchaim et al., 2008). The clinical significance of infections due to *Enterobacter cloacae* complex isolates has been reported in many publications, demonstrating their remarkable ability to upregulate or to acquire resistance determinants which make them some of the most worrying microorganisms of the current antibiotic era (Marchaim et al., 2008; Mezzatesta et al., 2012; Dai et al., 2012).

Carbapenems are the most potent β -lactam antibiotics and are considered the last resort for the treatment of serious infections caused by resistant strains of *Enterobacter* (Papp-Wallace et al., 2011). The resistance to carbapenems may involve the association between several mechanisms: changes in permeability of the outer membrane, efflux pumps hiperexpression, overproduction of AmpC-type cephalosporinase and extended-spectrum β -lactamase (ESBL), or production of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases (Nordmann et al., 2009).

Although the mechanisms of resistance to carbapenems are well studied and known, the carbapenem resistance is not always homogeneous. This phenomenon is called heteroresistance (Gordon et al., 2009).

Heteroresistance can be defined as resistance to certain antibiotics expressed by a subset of a microbial population that is generally considered to be susceptible to these antibiotics, according to *in-vitro* susceptibility testing. This fact may be the precursor of the emergence of a homogeneously resistant population (Falagas et al., 2008).

The heteroresistance to carbapenems was reported and related to the presence of carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* (Tato et al., 2010; Pournaras et al, 2010; Nodari et al, 2014), but the exact mechanism of heteroresistance, its genetic basis and its role in adaptation to antibiotic stress, have not been fully understood yet (Wang et al., 2014). Thus, were necessary more studies about the conections among the production of carbapenemases and heteroresistance.

The aim of this study was to evaluate imipenem and meropenem heteroresistance among *Enterobacter cloacae* complex isolates producing and not producing OXA-370.

METHODS

Bacterial strains

This study included 31 isolates *Enterobacter cloacae* complex isolates (one isolate by patient) recovered from four tertiary-care hospitals (Porto Alegre, Brazil), over a 9-month period from May 2013 to January 2014. All isolates were initially identified as ertapenem resistant and both carbapenems susceptible (imipenem and meropenem) by disk-diffusion. Five isolates were positive to *bla*_{OXA-370}.

The identification of isolates was confirmed by 16S rRNA gene sequencing using conventional PCR with specific primers for the amplification. PCR products were purified using the ExoStar kit (GE Healthcare) and sequenced using a BigDye Terminator kit (version 3.1) and an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The MICs for ertapenem, imipenem and meropenem were determined by broth microdilution and interpreted according to CLSI guidelines (CLSI, 2014). The presence of carbapenemase genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}) was confirmed by multiplex real time PCR (Monteiro et al., 2012) and the amplicons of *bla*_{OXA-48-like} were submitted to sequencing and proved to be the variant *bla*_{OXA-370}.

Heteroresistance

Heteroresistance to imipenem and meropenem was evaluated by population analysis profile (PAP). Briefly, a 20 μ L aliquot of each four-dilutions of suspensions of bacterial cells (10^8 CFU/mL) was plated on Mueller-Hinton agar plates in serial dilutions at concentration ranging from 0.125 to 8 μ g/mL of each antibiotic. In parallel, the same aliquot was plated on antibiotic-free medium.

Colonies were counted (CFU/mL) after 48h of incubation at 35°C. The limit of counting was 20 CFU/spot. The log₁₀CFU/mL was plotted against the antibiotic concentration. The frequency of heteroresistant subpopulations in the presence of the highest antibiotic concentration was calculated by dividing the number of colonies that grew on the antibiotic-containing plate by the colony counts from the same bacterial inoculum that grew on antibiotic-free plates

(Meletis, 2012). MICs for these subpopulations were determined by broth microdilution. Isolates presenting subpopulations that exhibited growth at imipenem or meropenem concentrations $\geq 4\mu\text{g/mL}$ were considered heteroresistant. Isolates containing subpopulations grown in antibiotic concentrations at least two times higher than the original MIC, but $< 4\mu\text{g/mL}$ were considered heterogeneous. The stability of the MIC of the subpopulations was determined after seven daily sub-cultures in antibiotic-free medium (Hermes et al., 2013). The analysis was performed twice for all isolates and the mean values estimated. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was included as quality control of the antibiotics in all tests.

RESULTS

Heteroresistance to imipenem:

A total of 21 (67.7%) isolates were characterized as imipenem-heterogeneous/heteroresistant, 6 (19.4%) of them presented heteroresistant subpopulations (three positive for *bla*_{OXA-370}) and 15 (48.4%) presented heterogeneous subpopulations (two positive for *bla*_{OXA-370}) (Table 1 - Figure 1). The frequency of imipenem-heteroresistant subpopulations, as calculated by the population analysis assays, ranged from 5.0×10^{-9} to 1.25×10^{-7} . Considering isolates with original MIC $< 1 \mu\text{g/mL}$ (21 isolates) only one was heteroresistant and for 10 isolates which original MIC was $1 \mu\text{g/mL}$, heteroresistance was detected in 5 isolates. All isolates positive for *bla*_{OXA-370} were classified as heteroresistant or heterogeneous. Only one heteroresistant isolate and one heterogeneous isolate (2/21 – 9.5%) kept the same MIC of the subpopulation after seven days in antibiotic free medium. None isolate presented in PAP subpopulations growth at imipenem concentrations higher than $4 \mu\text{g/ml}$.

Heteroresistance to meropenem:

A total of 6 (19.4%) isolates were characterized as meropenem-heterogeneous/heteroresistant, 1 (3.2%) of them presented heteroresistant subpopulations and 5 (16.1%) presented heterogeneous subpopulations (none positive for *bla*_{OXA-370}) (Table 2). The frequency of the meropenem-heteroresistant subpopulation, as calculated by the population analysis assays, was 7.14×10^{-8} . The heteroresistant isolate and one heterogeneous isolate (2/6 – 33.3%) kept the same MIC of the subpopulation after seven daily sub-culture in antibiotic free medium. None isolate presented in PAP subpopulations with growth at meropenem concentrations higher than $4 \mu\text{g/ml}$. However, 16 isolates (51.6%) (two positive-for *bla*_{OXA-370}) presented subpopulations with meropenem MIC higher than to $4 \mu\text{g/ml}$.

DISCUSSION

To guide antimicrobial therapy, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and other international committees established standard parameters and set breakpoints of the concentrations of antibiotics in order to classify isolates as susceptible, resistant or intermediately resistant to an antibiotic. However, the bacterial response to antibiotics is not always homogeneous. The heterogeneity of response to antimicrobial agents may not be detected in conventional antimicrobial tests.

Our study investigated the presence of heteroresistance to carbapenems in *Enterobacter cloacae* complex isolates. We found that imipenem-heterogeneous/heteroresistant subpopulation was common among *Enterobacter cloacae* complex (67.7%). However, it is not usual to meropenem (19.4%).

Heteroresistance to carbapenems in *Enterobacter cloacae* complex could be related to the acquisition of genes encoding production of carbapenemases as previously reported. Pournaras et al. (2010) and Nodari et al. (2014) reported a direct relationship between KPC production and heteroresistance to carbapenems in *K. pneumoniae*. In our study all OXA-370-producing isolates were classified as heterogeneous/heteroresistant and therefore, the presence of *bla*_{OXA-370} may be associated to the increase of heteroresistance to imipenem.

Studies have shown that among carbapenemase producer isolates (KPC and NDM), the heteroresistant subpopulations, present much higher MICs than the original population (concentrations up to 16 times higher than the original MIC) (Pournaras et al., 2010; Nodari et al., 2014). Conversely, we did not find subpopulations with MICs much higher than the original population in our study. This fact could be explained by the low level of hydrolytic activity of the OXA-370 to carbapenems (Oueslati et al., 2015) as most of the heteroresistant isolates were *bla*_{OXA-370}. Moreover, the hydrolytic capacity of OXA-370 has higher activity against imipenem than meropenem (Evans et al., 2014) and this may justify the fact that we have not found heteroresistance to meropenem in isolated producers OXA-370.

The parameters used to classify isolates as susceptible, resistant or intermediately resistant to an antibiotic are established to a homogeneous

population. In traditional *in-vitro* susceptibility testing when the majority of the population is susceptible, the presence of a small resistant subset near the cutoff, is undetectable. In this study, 50% of isolates had original MIC near to the cutoff (1µg/mL-Table 1) and were classified as heteroresistant to imipenem.

Only 4 heteroresistant/heterogeneous isolates remained with the same MIC after seven daily sub-culture in antibiotic free medium, suggesting that heteroresistance to carbapenems in *Enterobacter cloacae* complex may not be a stable phenomenon. The decrease in the MIC after seven daily cultures in antibiotic-free medium to OXA-370 producers isolates, can be explained by a temporary overexpression of the gene *bla*_{OXA-370}.

Three of the imipenem-heteroresistant (3/26 - 11.5%) and the meropenem-heteroresistant (1/26 - 3.8%) *Enterobacter cloacae* complex isolates were carbapenemase negative, suggesting that other factors are involved in the phenomenon.

Differences in transcriptional levels of the genes whose protein products are involved in multidrug efflux and decreased expression of the gene encoding an outer membrane porin, may also underline heteroresistance in *Pseudomonas* to carbapenems (Ikonomidis et al., 2008). How the *Enterobacter cloacae* complex resistance to carbapenems may involve several different combinations like: changes in permeability of the outer membrane by the absence or reduced expression of the two major porins (OmpC and OmpF) in combination with various β-lactamases (Doumith et al., 2009), another mechanism of resistance can be associated for improved heteroresistance to carbapenems.

Finally, it should be noted that 16 isolates exhibit subpopulation MIC of ≥4µg/ml to meropenem (Table 2). This finding may suggest that some cells in a population may be induced to become resistant in the presence of the antibiotic during the PAP experiment but these isolates cannot be classified as heteroresistant, according to Hermes et al. (2013).

Acknowledgements:

Financial support:

This work was supported by the Fund for the Encouragement of Research and Events of the Porto Alegre-Clinical Hospital (FIPE / HCPA), A.L.B. are research fellows from the National Council for Scientific and Technological Development, Ministry of Science and Technology, Brazil and A.E.B.S. receives master scholarship from Higher Education Personnel Training Coordination (CAPES), Brazil.

REFERENCES

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2014). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th informational supplement. 24^oed.*, no. 1, M100-S24. Wayne, PA: CLSI, 2014.
2. **Dai, W., Sun, S., Yang, P., Huang, S., Zhang, X. and Zhang, L.** (2013). Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. *Infection, Genetics and Evolution*, **14**, 1-7.
3. **Doumith, M., Elington, M.J., Livermore, D.M., Woodford, N.** (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 659-667.
4. **Evans, B. and Aimes, S. G. B.** (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* **27**, 241–263.
5. **Falagas, M.E., Makris, G.C., Dimopoulos, G. and Matthaiou, D.K.** (2008). Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 101-4.
6. **Gordon, N.C.; Wareham, D.W.** (2009). Failure of the MicroScan WalkAway System to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 3024-3025.
7. **Hermes, D.M., Pormann Pitt, C., Lutz, L., Teixeira, A.B., Ribeiro, V.B., Netto, B., Martins, A.F., Zavascki, A.P. and Barth, A.L.** (2013). Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, **62**, 1184-1189.
8. **Marchaim, D., Navon-Venezia, S., Schwaber, M.J. and Carmeli, Y.** (2008). Isolation of Imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC - 2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **52**, 1413-18.

9. **Meletis, G.**(2012) Heteroresistance. *Infection Control – Updates*, Dr. Christopher Sudhakar (ed.) ISBN: INTECH. Available in: <http://www.intechopen.com/books/infection-control-updates/heteroresistance>.
10. **Mezzatesta, M.L., Gona, F. and Stefani, S.** (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, **7**, 887-902.
11. **Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A. C., Kubasek, C. and Silbert, S.** (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **67**, 906– 909.
12. **Nodari C.S., Ribeiro, V.B. and Barth, A.L.** (2014). Imipenem heteroresistance: high prevalence among *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers. *Journal of Medical Microbiology*, **64**, 124-6.
13. **Nordmann, P., Cuzon, G. and Naas, T.** (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, **9**, 228-236.
14. **Oueslati, S.; Nordmann, P. and Poirel, L.** (2015). Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like b-lactamases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. pii: dku524.
15. **Papp-wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. and Bonono, R. A.** (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, p. 4943-60, Nov. 2011.
16. **Pournaras, S., Kristo, I., Vrioni, G., Ikonomidis, A., Poulou, A., Petropoulou, D. and Tsakris, A.** (2010). Characteristics meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) – Producing Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 2601-2604.g
17. **Tato, M., Morosini, M., Garcia, L., Alberti, S., Coque, M.T. and Cantón, R.** (2010). Carbapenem heteroresistance in VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 4089-4093.
18. **Wang, X., Kang, Y., Luo, C., Zhao, T., Liu, L., Jian, X., Fu, R., An, S., Chen, J., Jiang, N., Ren, L., Wang, Q., Baillie, J.K., Gao, Z. and Yu, J.**

(2014). Heteroresistance at the single-cell level: Adpting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination. *MBio*, **5**, e00942-13.

19. **Zavascki, A.P., Falci, D.R., da Silva, R.C., Dalrosa, M.G., Ribeiro, V.B., Rozales, F.P., Luz, D.I., Magagnin, C.M., Vieira, F.J., Sampaio, J.M. and Barth, A.L.** (2014). Heteroresistance to carbapenems in New Delhi Metallo-beta-lactamase-1-producing isolates: a challenge for detection? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **35**, 751-752.

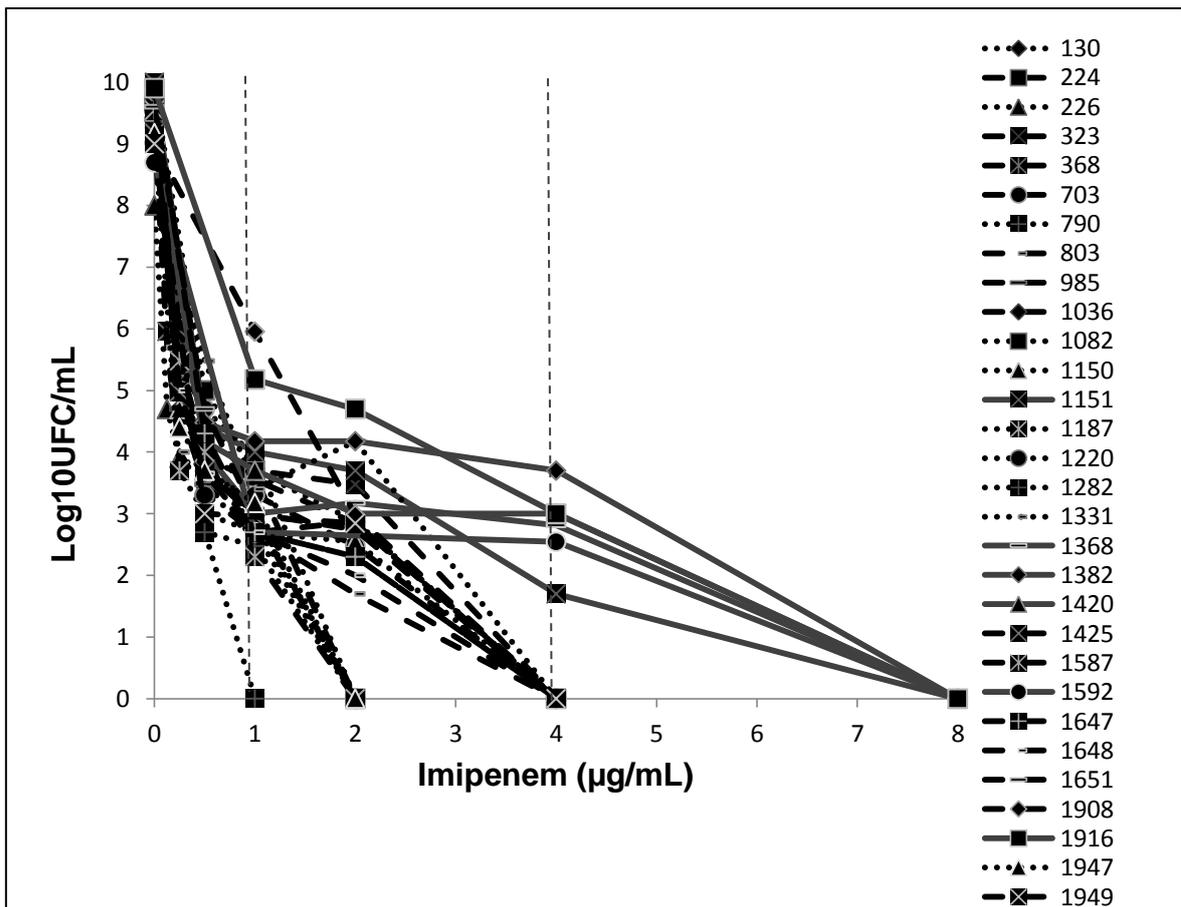


Figure 1: Population analysis profile (PAP) to imipenem. Homogeneous populations (dotted lines); Heterogeneous subpopulations (dashed lines) and Heteroresistant subpopulations (solid lines).

Table 1.: Results of Population analysis profile (PAP) to imipenem.

Strain	Original IMP MIC (µg/mL)	Highest IMP concentration were growth occurred in PAP (µg/mL)	PAP subpopulation MIC –IMP (µg/mL)	MIC After 7 days daily passages in drug-free medium (µg/mL)	Classification
Non-carbapenemase producer					
130F	0,5	1	1	0,5	
224F	0,25	1	0,5	0,25	HG
226F	0,5	1	1	0,5	
323F	0,5	2	0,5	0,5	HG
368F	0,5	2	2	0,5	HG
703F	0,5	2	0,5	0,5	HG
790F	0,25	0,5	0,5	0,25	
803F	0,5	2	4	4	HG
985F	0,5	2	1	0,125	HG
1036F	0,5	2	0,5	0,25	HG
1082F	1	2	1	0,5	
1150F	1	2	1	0,5	
1151F	1	4	1	0,5	HR
1187F	1	1	1	0,5	
1220F	0,5	1	1	0,125	
1282F	1	1	1,0	0,5	
1331F	1	2	1	0,5	
1382F	1	4	16	8	HR
1385F	0,5	2	1	0,5	HG
1425F	0,25	1	1	0,25	HG
1587F	0,125	1	0,5	0,125	HG
1648F	0,125	2	2	0,5	HG
1908F	0,5	2	1	0,125	HG
1916F	1	4	4	4	HR
1947F	0,5	1	1	0,5	
1949F	0,5	2	2	0,25	HG
OXA-370 producers					
1368F	1	4	2	0,5	HR
1420F	1	4	2	0,5	HR
1592F	0,5	4	2	0,25	HR
1647F	0,25	2	1	0,25	HG
1651F	0,5	2	2	0,5	HG

HG: Isolate which presented heterogeneous subpopulation; HR: Isolate which presented heteroresistant subpopulation.

Table 2.: Results of Population analysis profile (PAP) to meropenem.

Strain	Original MPM MIC (µg/mL)	Highest MPM concentration were growth occurred in PAP (µg/mL)	PAP subpopulation MIC –MPM (µg/mL)	MIC After 7 days daily passages in drug-free medium (µg/mL)	Classification
Non-carbapenemase producer					
130F	0,5	1	2	2	-
224F	0,25	0,25	0,25	1	-
226F	0,25	2	8	0,25	HG
323F	1	1	4	2	-
368F	0,5	1	4	4	-
703F	0,5	1	0,5	0,5	-
790F	0,25	0,25	0,25	0,125	-
803F	0,5	2	4	2	HG
985F	0,5	1	1	0,5	-
1036F	1	1	2	4	-
1082F	0,5	2	4	2	HG
1150F	0,5	1	0,5	0,25	-
1151F	0,25	2	4	1	HG
1187F	0,5	0,5	8	4	-
1220F	0,5	0,5	1	0,5	-
1282F	0,5	0,5	0,25	1	-
1331F	0,5	1	8	8	-
1382F	1	4	16	16	HR
1385F	0,5	2	4	4	HG
1425F	0,5	0,5	4	0,5	-
1587F	0,25	0,25	0,5	0,25	-
1648F	0,5	0,5	4	1	-
1908F	0,5	1	4	2	-
1916F	1	1	8	4	-
1947F	0,5	1	2	2	-
1949F	0,5	1	8	2	-
OXA-370 producers					
1368F	0,5	1	8	8	-
1420F	0,25	0,25	0,25	0,125	-
1592F	1	1	8	1	-
1647F	0,5	0,5	2	1	-
1651F	0,5	0,5	1	1	-

HG: Isolate which presented heterogeneous subpopulation; HR: Isolate which presented heteroresistant subpopulation;

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Para orientar a terapêutica antimicrobiana, comitês internacionais estabelecem parâmetros padronizados definindo pontos de corte das concentrações de antibióticos, a fim de classificar os isolados como sensíveis, resistentes ou intermediários a um antibiótico. No entanto, a resposta bacteriana aos antibióticos nem sempre é homogênea. Quando um subconjunto de população microbiana é resistente a um antibiótico, enquanto a população é classificada como sensível (com base nos pontos de corte em testes de susceptibilidade *in vitro*) este é caracterizada como heteroresistente. O fenômeno da heteroresistência aos agentes antimicrobianos, embora já descrita, ainda precisa ser melhor estudada quanto às suas bases genéticas, os mecanismos envolvidos e o seu papel na evolução para um perfil de resistência homogênea a fim de se estabelecer qual o real impacto clínico deste fenômeno.

Esse é o primeiro estudo a investigar a presença de heteroresistência aos carbapenêmicos em isolados do complexo *Enterobacter cloacae* produtores ou não de carbapenemase OXA-370 sendo que foi possível observar que:

- A presença de subpopulações heterogêneas/heteroresistentes ao imipenem (21/31 - 67,7%) são comuns nos isolados do complexo *Enterobacter cloacae*. Porém, o mesmo já não ocorre para o meropenem (6/31 – 19,4%).
- Todos os isolados produtores de OXA-370 apresentaram subpopulações heterogêneas/heteroresistentes ao imipenem (3/5 - 60% heteroresistentes e 2/5 - 40% heterogêneas).
- Nenhum isolado apresentou crescimento na Análise de Perfil Populacional (PAP) acima de 4µg/mL.
- Os CIMs para os carbapenêmicos obtidos após o PAP foram mais baixos que os demonstrados em outros estudos em subpopulações de isolados produtores de carbapenemases como KPC e NDM.

- Isolados que apresentaram CIMs próximos ao ponto de corte para imipenem (1µg/mL) apresentaram uma maior ocorrência de populações heteroresistentes (5/10 – 50%).
- A heteroresistência aos carbapenêmicos não se mostrou estável após sete dias de sub-cultivo em meio livre de antibiótico. Apenas duas populações homogêneas e duas heteroresistentes mantiveram a CIM após sete dias de sub-cultivo em meio livre de antibiótico (4/27 – 14,8%).
- Houve a ocorrência, embora menor, de subpopulações heteroresistentes a ambos os carbapenêmicos nos isolados não produtores de carbapenemases (3/26 – 11,5%).
- Em relação ao meropenem foi notório a presença de subpopulações heterogêneas, que embora não tivessem crescido no PAP em concentrações maiores de 2µg/mL, obtiveram MIC ≥4µg/mL (16/31 – 51,6%).

Os resultados observados neste estudo nos permitem sugerir que a presença do *bla*_{OXA-370} pode estar associada a uma maior ocorrência de subpopulações heteroresistentes ao imipenem. Por outro lado, a ocorrência de subpopulações heteroresistentes em isolados não produtores de OXA-370 demonstra que outros mecanismos podem também estar associados à ocorrência de subpopulações heteroresistentes aos carbapenêmicos. Assim, estudos moleculares se fazem necessários para confirmação dos achados e melhor esclarecimento quanto aos outros mecanismos envolvidos.

Os resultados encontrados são de grande valia no estudo da heteroresistência e sua caracterização. Muito ainda há para ser avaliado buscando a melhor compreensão deste fenômeno e seu real impacto clínico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa) - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012) Boletim Informativo nº 07: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, março 2014. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/07-rede-nacional-de-monitoramento-da-resistencia-microbiana-em-servicos-de-saude-rede-rm-resistencia-microbiana-em-ipcsl-relacionada-a-cvc-em-uti-2012>
2. ANTUNES et al. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 58, n. 4, p. 2119-25, 2014.
3. BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 28, p. 12-22, aug. 2013.
4. BORNET, C. et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochemical Biophysical Research Communication*, v. 301, n. 4, p. 985-990, feb. 2003.
5. BRADY, C. et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, p. 309– 31, 2013.
6. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th*

- informational supplement*. 24^oed., no. 1, M100-S23. Wayne, PA: CLSI, 2014.
7. DAI, W. et al. Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in Chinese hospital in Chongqing. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 14, p. 1-7, mar. 2013.
 8. DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. Clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 4, p. 659-667, feb. 2009.
 9. EL-HALFAWY, O. M. ; VALVANO, M. A. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 1, p. 191-207, Jan. 2015.
 10. EVANS, B.; AYMES, S. G. B. OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2, p. 241–263, april 2014.
 11. FALAGAS, M. E. et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 2, p. 101-4, feb. 2008.
 12. FERNANDEZ CUENCA, F. et al. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 39, n. 6, p. 472-7, June 2012.
 13. GARCIA FERNADEZ, A. et al. An ertapenem-resistant extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OMPK36 porin variant. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4178-4184, oct. 2010.
 14. GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Failure of the MicroScan WalkAway System to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n. 9, p. 3024-3025, sept. 2009.
 15. HERMES, D. M. et al. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 1184-1189, Aug. 2013.

16. HIRAMATSU, K. et al. Dissamination in Japanese Hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, v. 350, n. 9092, p. 1670-3, dec. 1997.
17. IKONOMIDIS A. et al. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 47, n. 12, p. 4055-9, dec. 2009.
18. MARCHAIM, D. et al. Isolation of Imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC - 2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 52, n.4, p. 1413-18, apr. 2008.
19. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ J. J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 32, n. 4, p. 4-9, dec. 2014.
20. MELETIS, G. Heteroresistance. *Infection Control – Updates*, Dr. Christopher Sudhakar (ed.) ISBN: INTECH, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/infection-control-updates/heteroresistance>.
21. MEZZATESTA, M.L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 887-902, jul. 2012.
22. NAAS, T.; NORDMANN, P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, v. 91, n. 16, p. 7693-7697, aug. 1994.
23. NODARI C. S., RIBEIRO, V. B. AND BARTH, A. L. Imipenem heteroresistance: high prevalence among *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, p. 124-6, 2015.
24. NOGUEIRA K.da. S., et al. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter spp.* in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.32, n. 2, p. 87-92, feb. 2014.

25. NORDMAN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.
26. NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, v. 9, p. 228-236, apr. 2009.
27. NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 5, p. 263-272, may. 2012.
28. NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide *Clinical Microbiology Infections*, v. 20, p. 821–830, Jun. 2014.
29. OUESLATI, S, NORDMANN, P., POIREL, L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dku524, jan. 2015.
30. PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 4943-60, Nov. 2011.
31. POIREL L, POTRON A, NORDMANN P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 1597–1606, 2012.
32. POURNARAS S, et al. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 66–70, jan. 2007.
33. POURNARAS, S. et al. Characteristics meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) – Producing Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 7, p. 2601-2604, jul.2010.
34. RYFFEL, C. et al. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 38, n. 4, p.724-728, apr. 1994.
35. SAMPAIO, J. L. M. et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 6, p. 3566-7, Jun. 2014.

36. SIEVERT, D.M. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 34, n. 1, p. 1-14, jan. 2013.
37. TATO, M. et al. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 11, p. 4089-4093, nov. 2010.
38. WANG, X. et al. Heteroresistance at the single-cell level: Adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination. *MBio*, v. 5, p. e00942-13, 2014.
39. WOOTTON, M. et al. A modified population analysis method (PAP) to detect heteroresistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 4, p. 399–403, apr. 2001.
40. YANG, F. C. et al. Characterization of Ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese University Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 223–226, Feb. 2012.
41. YOSHIDA, R. et al. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, n. 2, p. 247-255, feb. 2003.
42. ZAVASCKI, A. et al. Heteroresistance to carbapenems in New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing isolates: a challenge for detection? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.35, n. 6, p. 751-2, Jun. 2014.