UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo- β -lactamase

Juliana Coutinho Campos

Tese de Doutorado apresentada à Comissão Julgadora do Departamento de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2017

Juliana Coutinho Campos

Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo- β -lactamase

Tese de Doutorado apresentada à Comissão Julgadora do Departamento de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Versão corrigida conforme resolução CoPGr 6018.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

C198e Campos, Juliana Coutinho
Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo-beta-lactamase / Juliana Coutinho Campos. - São Paulo, 2017.
125 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Resistência Bacteriana. 2. Bacilos Gram-negativos. 3. New Delhi metalo- β -lactamase. 4. Plasmídeos. I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Coutinho Campos

Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo- β -lactamase

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutora

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
Orientador / Presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

DEDICO ESTE TRABALHO...

Ao meu **pai**, meu herói e amigo, meu exemplo de humildade e caridade.

À minha **mãe**, minha heroína e amiga, meu exemplo de amor e solidariedade.

Ao meu **irmão**, pelo amor infinito.

Ao meu **marido**, pela ajuda, paciência, companhia e amor.

Ao meu **orientador**, Jorge Sampaio, pela dedicação, ensinamentos, disponibilidade e oportunidade.

AGRADEÇO...

O Deus, pela sabedoria, força e confiança.

Aos meus **pais e meu irmão**, pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida. Pai e Mãe sem vocês eu não teria conseguido chegar onde estou. Amo vocês!

Ao meu **marido**, pelo amor e companheirismo. Você é meu melhor amigo, sempre disposto a me ajudar, me ensinar e aprender comigo. Amo você!

Ao **Prof. Dr. Jorge Sampaio**, pessoa indescritível, não tenho palavras para agradecer a imensa oportunidade de fazer parte de sua trajetória profissional. Obrigada por sempre acreditar em mim e por me ajudar em meu amadurecimento profissional. Minha eterna gratidão.

À técnica, **Fabiana**, pelo auxílio no projeto, conversas diversas e amizade.

Aos meus **amigos** do Laboratório de Microbiologia Clínica, pela descontração, debates científicos e auxílio no término deste projeto de pesquisa. Cito-os: Darlan, Mayne, Elaine, Bruna, Adriana, Flávia, Lilian, Silvia e Suely.

Ao **Laurent Poirel**, por nos ceder a cepa controle de *bla*_{NDM-1}.

À **Eva Top** por nos ceder o plasmídeo pB10 em *E. coli* DH5α para o experimento de transposição.

Ao **Célio de Faria Júnior** do Núcleo de Bacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Lacen de Brasília/DF por disponibilizar a cepa de *E. coli* para este estudo.

Ao **Michael Gilmore** pela revisão do artigo publicado com os dados deste projeto de pesquisa.

Aos envolvidos no **artigo científico** publicado com os dados deste projeto de pesquisa.

Ao **Instituto Fleury** por disponibilizar os isolados para este estudo e pelo financiamento do projeto de pesquisa, sem os quais este estudo não seria possível.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa oferecida.

“All our dreams can come true, if we
have the courage to pursue them”.

Walt Disney

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP – Parte I (ABNT). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro e colaboradores. 3ª ed. Revisada, ampliada e modificada. São Paulo, 2016.

RESUMO

CAMPOS, J.C. Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo- β -lactamase. **Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2017.

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais amplamente utilizados no tratamento empírico de infecções graves por bacilos Gram-negativos. A pressão seletiva gerada pelo uso desses antimicrobianos ao longo das últimas três décadas contribuiu para a disseminação de enterobactérias e Gram-negativos não fermentadores produtores de carbapenemases, particularmente as do tipo KPC e NDM. Os genes que codificam essas enzimas usualmente estão localizados em plasmídeos e/ou transpósons. A hipótese atualmente mais aceita é que o gene *bla*_{NDM-1} seja uma quimera criada em *Acinetobacter baumannii*. A NDM-1 foi descrita em paciente proveniente da Índia e subsequentemente evidenciou-se sua ampla disseminação nesse país. A epidemiologia que tem sido observada nos casos detectados na Europa e Estados Unidos tem sido viagem à Índia, ou seja, sem casos autóctones. No Brasil, os primeiros casos foram identificados no Rio Grande do Sul, e a seguir no Rio de Janeiro e em São Paulo. Diferentemente dos casos da Europa e América do Norte, os casos do Brasil não tem relação epidemiológica com a Índia. O sequenciamento integral dos plasmídeos e cromossomos albergando o gene *bla*_{NDM} permitirá entender como ocorre a disseminação desse mecanismo de resistência no Brasil. Para isso, foi avaliado o perfil de susceptibilidade dos isolados, bem como a capacidade conjugativa e clonalidade. Das vinte e oito amostras utilizadas neste trabalho, treze delas pertencem à espécie *Enterobacter hormaechei*, uma à espécie *Citrobacter freundii*, sete à espécie *Escherichia coli*, quatro à *Klebsiella pneumoniae* e três ao gênero *Acinetobacter* spp. Os primeiros isolados incluídos neste estudo (*Escherichia coli* e *Enterobacter hormaechei* produzindo NDM-1) foram isolados em agosto de 2013, de uma mesma amostra de swab retal de um paciente do Rio de Janeiro que nunca viajou para o exterior. O sequenciamento completo do DNA plasmidial utilizando a plataforma Illumina e a anotação de ambos os plasmídeos albergando o gene *bla*_{NDM-1} revelou que estes pertencem a grupos de incompatibilidade diferentes, IncFII_K (*E. hormaechei*) e IncX3 (*E. coli*), e abrigam um novo transpósom composto designado Tn3000. A comparação da sequência nucleotídica do Tn3000 com aquelas disponíveis no GenBank evidencia que a mesma estrutura está presente em plasmídeos de isolados da cidade de Porto Alegre e também em diferentes continentes. As espécies de *Acinetobacter* (*A. radioresistens*, *A. ursingii* e *A. guillouiae*) isoladas em São Paulo e Porto Alegre, possuem o gene *bla*_{NDM-1} albergados em um mesmo plasmídeo não tipável de 41.087 pb. A avaliação da clonalidade dos isolados de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” mostrou dois perfis diferentes através da técnica de PFGE, sendo que todos os microrganismos foram isolados de um surto

no mesmo hospital no Rio de Janeiro. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* de uma mesma paciente internada em hospital em Salvador, de sítios distintos - swab retal, hemocultura e urina, em ordem cronológica - obtiveram o mesmo perfil clonal pela técnica de PFGE. O mesmo ocorreu com três isolados de *Escherichia coli*, de um mesmo paciente do Rio de Janeiro, em amostras de swab retal. Os achados deste estudo evidenciam que no Brasil, Nepal, Marrocos e Índia há uma disseminação do gene *bla*_{NDM-1} mediada por um novo elemento móvel designado Tn3000 em enterobactérias. A detecção de um mesmo plasmídeo em diferentes espécies de *Acinetobacter* evidencia que neste gênero bacteriano, no Brasil, a disseminação do gene *bla*_{NDM-1} ocorre por conjugação.

Palavras-chave: *bla*_{NDM-1}, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, plasmídeos, Tn3000, IncFII_K, IncX3, transpóson.

ABSTRACT

CAMPOS, J.C. Genotypic and fenotypic study of Gram-negative bacilli producers carbapenemase type New Delhi metallo- β -lactamase. **Doctoral Thesis – School of Pharmacy, University of Sao Paulo**, Sao Paulo, 2017.

Carbapenems are the antimicrobials most widely used in the empirical treatment of severe infections caused by Gram-negative bacilli. The selective pressure generated by the use of these antibiotics over the last three decades has contributed to the spread of enterobacteria and Gram-negative non-fermenting producing carbapenemases, mainly KPC and NDM. Genes encoding these enzymes are usually located in plasmids and/or transposons. Currently the most accepted hypothesis is that the *bla*_{NDM-1} gene is a chimera created in *Acinetobacter baumannii*. The NDM-1 was described in a patient from India and subsequently was reported to be broadly disseminate in this country. The epidemiology that has been observed in cases detected in Europe and United States is traveling to India, but no autochthonous cases. In Brazil, the first cases were identified in Rio Grande do Sul, and then in Rio de Janeiro and São Paulo. Differently from the cases described in Europe and North America, the cases from Brazil have no epidemiological link with India. The complete sequencing of plasmids and chromosomes harboring *bla*_{NDM} gene will understanding how the dissemination of this resistance mechanism in Brazil occurs. In this work we will be evaluate the susceptibility profile of the isolates, and their conjugal capacity and clonality. Of the twenty-eight samples used in this study, thirteen of them belong to the species *Enterobacter hormaechei*, one to *Citrobacter freundii*, seven to *Escherichia coli*, four to *Klebsiella pneumoniae* and three to the genus *Acinetobacter* sp. The first two isolates included in this study (*Escherichia coli* and *Enterobacter hormaechei*) were isolated in August 2013, from the same rectal swab sample from a patient from Rio de Janeiro that never traveled abroad. Complete sequencing of plasmid DNA using Illumina platform and annotation of both plasmids harboring the *bla*_{NDM-1} gene revealed that they belong to different incompatibility groups, IncFII_K (*E. hormaechei*) and IncX3 (*E. coli*), and are harbor to a new transposon designated Tn3000. The comparison of the Tn3000 nucleotide sequence with those available at GenBank shows that the same structure is present in plasmids from other Porto Alegre and also in different continents. The *Acinetobacter* species (*A. radioresistens*, *A. ursingii* and *A. guillouiae*) isolated in São Paulo and Porto Alegre, have the *bla*_{NDM-1} gene harbored in a single non-typing plasmid of 41,087 bp. The evaluation of clonal relationship of *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” showed two different profiles by PFGE technique; of note all microorganisms were isolated from an outbreak in the same hospital in Rio de Janeiro. Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from a single patient hospitalized in Salvador, from different anatomical sites - rectal swab, blood culture and urine, in chronological order - obtained the same clonal profile by the PFGE technique. The same occurred with three *Escherichia coli* isolates, from the same patient from Rio de

Janeiro, in swab rectal strains. Our findings suggest that in Brazil, Nepal, Morocco and India there is a spread of *bla*_{NDM-1} gene mediated by Tn3000 in enterobacteria. The detection of a same plasmid in different species of *Acinetobacter* shows that in this bacterial genus, in Brazil, the dissemination of the *bla*_{NDM-1} gene occurs by conjugation.

Keywords: *bla*_{NDM-1}, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, plasmids, Tn3000, IncFII_K, IncX3, transposon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos	19
Figura 2	Classificação das enzimas β -lactamases	23
Figura 3	Países nos quais bactérias positivas para NDM foram reportadas até abril de 2017	29
Figura 4	Informações da sequência encontrada anteriormente ao gene <i>bla</i> _{NDM-1} , em diferentes espécies bacterianas, em diferentes regiões geográficas	32
Figura 5	Ambiente genético de <i>bla</i> _{NDM-1} e <i>bla</i> _{MBL}	33
Figura 6	Diferentes ambientes genéticos de <i>bla</i> _{NDM-1} em enterobactérias, <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 7	Perfil de clonalidade das amostras de <i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>oharae</i> ” isoladas no Rio de Janeiro albergando o gene <i>bla</i> _{NDM-1}	62
Figura 8	Perfil plasmidial dos isolados selvagens e seus transformantes	63
Figura 9	Perfil plasmidial dos transformantes	65
Figura 10	Perfil plasmidial de <i>Acinetobacter</i> spp.	65
Figura 11	Mapa circular do plasmídeo IncFII _K do transformante de <i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>Steigerwaltii</i> ” E0083033-1	68
Figura 12	Mapa circular do plasmídeo IncX3 do transformante de <i>Escherichia coli</i> E0083033-2	70
Figura 13	Teste fenotípico para avaliar a atividade de <i>bla</i> _{OXA-30}	72
Figura 14	Primers utilizados para confirmação do Tn3000 e seus respectivos alvos	73
Figura 15	Comparação linear de diferentes plasmídeos albergando o transpóson Tn3000 no mundo	74

Figura 16	Polimorfismos no transpóson Tn3000 em diferentes plasmídeos no mundo	75
Figura 17	Perfil plasmidial dos transformantes	78
Figura 18	Comparação linear de plasmídeos de diferentes tamanhos e gêneros bacterianos albergando o transpóson Tn3000	79
Figura 19	Perfil plasmidial dos transformantes	80
Figura 20	Comparação linear dos nucleotídeos dos plasmídeos pEh1A e pEh18A	80
Figura 21	Imagem do pEh1A demonstrando a região de inserção de 40 pb no plasmídeo pEh18A	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variantes da enzima NDM depositadas no GenBank	26
Tabela 2	Países que identificaram o gene <i>bla</i> _{NDM}	27
Tabela 3	Amostras utilizadas neste estudo	41
Tabela 4	Primers utilizados neste estudo	43
Tabela 5	Isolados bacterianos pertencentes ao gênero <i>Enterobacter</i> spp.	60
Tabela 6	Amostras selecionadas para transformação	64
Tabela 7	Concentrações inibitórias mínimas para os isolados selvagens e seus transformantes	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
g	Aceleração da gravidade
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrometro
A	Absorbância
BKC	Enzima Brazilian <i>Klebsiella</i> Carbapenemase
<i>bla</i>	β-lactamase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>ble</i> _{MBL}	Gene <i>ble</i> associado com a metalo- β-lactamase NDM
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standard Institute
cm	Centímetro
CMY	Enzima ativa com cefamicina
CTX-M	Enzima ativa com cefotaxima
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	β-lactamase de espectro ampliado
GES	Enzima Guiana de espectro estendido
IMP	Enzima ativa com imipenem
In	Integron
Inc	Grupo de Incompatibilidade
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
Is	Sequência de inserção
Kb	Quilobase (1000 pb)
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
Kv	Quilovolts
LB	Luria Bertani
MBL	Metalo-β-lactamase
mg	Miligrama

mm	Milímetro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
N	Normal
NCTC	National Collection of Type Cultures
NDM	New Delhi metalo- β -lactamase
nm	Nanômetro
OMP	Proteína de membrana externa
OXA	Enzima oxacilinase
pb	Pares de base
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em campos alternados
pH	Potencial hidrogeniônico
RAST	Rapid Annotation using System Technology
rpm	Rotação por minuto
SHV	Enzima variável do reagente Sulfidril
SME	Enzima <i>Serratia marcescens</i>
SOC	Super Optimal Broth
SPM	Enzima São Paulo metalo- β -lactamase
ST	Sequence Typing
TE	Tampão Tris e EDTA
TEM	Enzima Temoneira
Tn	Transpóson
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Voltagem
VIM	Enzima Verona
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Importância dos β -lactâmicos na prática clínica	19
1.2	Resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos	21
1.3	Enzimas β -lactamases	22
1.4	Metalo- β -lactamases (MBLs)	24
1.5	New Delhi metalo- β -lactamases (NDM)	26
1.6	Contexto genético de <i>bla</i> _{NDM}	30
1.7	Dados nacionais de <i>bla</i> _{NDM}	34
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Isolados bacterianos	40
4.2	Identificação bacteriana	42
4.3	Extração de DNA genômico pelo método de lise térmica	45
4.4	Deteção de genes codificando carbapenemases e sequenciamento integral do gene <i>bla</i> _{NDM}	45
4.5	Preparo de células eletrocompetentes	46
4.6	Extração de DNA plasmidial de <i>Enterobacteriaceae</i>	47
4.7	Extração de DNA plasmidial de <i>Acinetobacter</i> spp.	48
4.8	Transformação em <i>Escherichia coli</i> TOP10 por eletroporação	49
4.9	Ensaio de conjugação	49
4.10	Perfil plasmidial dos isolados bacterianos selvagens, transformantes e transconjugantes	50
4.11	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	51
4.12	Teste fenotípico para verificação da funcionalidade de <i>bla</i> _{OXA-30}	51
4.13	Eletroforese em campos alternados (PFGE)	52
4.14	Sequenciamento de nova geração de plasmídeos e genomas – Plataforma Illumina	53
4.14.1	Protocolo Nextera DNA	53

4.14.2	Protocolo Nextera XT	54
4.14.3	Protocolo Mate-Pair	54
4.15	Forma de análise dos resultados dos sequenciamentos	54
4.16	Ensaio de transposição	55
4.16.1	Clonagem do transpóson Tn3000 em vetor pUC19	55
4.16.2	Transformação por eletroporação em <i>E. coli</i> DH5α contendo pB10	56
4.16.3	Transposição por elevação de temperatura	56
4.16.4	Conjugação em <i>E. coli</i> J53	57
4.16.5	Sequenciamento da cepa J53 pB10::Tn3000C	58
4.17	Verificação da presença do Tn3000 nos plasmídeos deste estudo	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Identificação bacteriana e triagem para genes codificando carbapenemases	59
5.2	Eletroforese em campos alternados (PFGE)	60
5.3	Perfil plasmidial, ensaios de transformação e conjugação	63
5.4	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	66
5.5	Análise da sequência do plasmídeo pEh1A	67
5.6	Análise da sequência do plasmídeo pEc2A	70
5.7	Atividade de <i>bla</i> _{OXA-30}	72
5.8	Transpóson Tn3000	72
5.9	Ensaio de transposição	76
5.10	Presença do Tn3000 em outros plasmídeos de isolados deste estudo	77
5.11	Análise da sequência dos plasmídeos pEh18A e pEh19A	79
5.12	Comparação plasmidial dos transformantes TF1A e TF18A	80
5.13	Análise das sequências dos plasmídeos detectados em <i>Acinetobacter</i>	81
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICE	104
	APÊNDICE A – Artigo científico	104
	ANEXOS	114
	ANEXO A – Currículo Lattes	114
	ANEXO B – Ficha do aluno USP	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos β -lactâmicos na prática clínica

Os β -lactâmicos consistem na classe de antimicrobianos com maior número de compostos atualmente em uso clínico. Desde a descoberta da penicilina G, o primeiro antimicrobiano β -lactâmico introduzido na prática médica, vários compostos distintos dessa classe foram colocados em uso clínico, como as amino/penicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta geração, monobactâmicos e carbapenêmicos (Donowitz and Mandell 1988; Donowitz and Mandell 1988).

O mecanismo de ação dos β -lactâmicos é a inibição das transpeptidases (Figura 1) que desempenham um papel essencial na síntese da parede celular bacteriana. As transpeptidases são um importante alvo terapêutico por não haver homólogos em eucariotos. São comumente nomeadas de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), dada a importância como alvo terapêutico. Essas enzimas têm importante função na transpeptidação e transglicosilação durante a síntese do peptidoglicano (Amato Neto, Nicodemo et al. 2007).

Figura 1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos (modificada de Wikimedia Commons: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Penicillin_inhibition.svg>). (1) Enzima transpeptidase (cinza) com seu sítio ativo livre. (2) Transpeptidase realizando a síntese da parede celular. (3) Antimicrobiano β -lactâmico ligando-se no sítio ativo da transpeptidase. (4) Antimicrobiano β -lactâmico bloqueando a entrada de cadeias polipeptídicas do NAG e NAM no sítio ativo da enzima, interrompendo a transpeptidação da cadeia, causando falha na produção de parede celular e, posteriormente, morte celular.

Para atingir o espaço periplasmático, no qual estão localizadas as PBPs, os β -lactâmicos utilizam principalmente proteínas de membrana que formam canais de transporte: as porinas (Procop, Church et al. 2017). Uma vez no espaço periplasmático, os β -lactâmicos, que são análogos estereoquímicos do segmento ativo das PBPs, ligam-se ao sítio ativo destas enzimas tornando-as indisponíveis para a síntese da camada de peptidoglicano da célula bacteriana. Como a atividade das hidrolases para o remodelamento da parede é contínuo, há uma desestruturação da camada de peptidoglicano em função da falha da atividade de síntese pelas transpeptidases (Amato Neto, Nicodemo et al. 2007).

Os carbapenêmicos, foco deste estudo, são produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces* e constituem uma subclasse de antimicrobianos β -lactâmicos derivados do núcleo carbapenêmico. Em 1979, um derivado estável foi isolado, denominado N-formimidoil-tienamicina, e tornou-se disponível comercialmente, com o nome de imipenem. Uma limitação deste fármaco é sofrer hidrólise pela dipeptidase renal, o que reduz significativamente a meia-vida do fármaco. Com a descoberta da cilastatina, composto com alta afinidade pela dipeptidase, impediu-se a degradação renal do imipenem. Assim, a apresentação farmacológica disponível do imipenem é associada à cilastatina (Tavares 1996).

Posteriormente, novos fármacos deste grupo foram descobertos e apresentam uma vantagem sobre o imipenem: não precisam ser associados à cilastatina, pois possuem um radical metila, associado ao carbono 1, que confere proteção à ação hidrolítica da dipeptidase renal. Esses antimicrobianos possuem atividade bactericida contra uma ampla gama de microrganismos. Seu espectro antimicrobiano abrange enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores e anaeróbios, esporulados ou não (Pfaller and Jones 1997).

O aumento do uso desses antimicrobianos como primeira linha de tratamento contra infecções graves, particularmente aquelas causadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL), contribuiu como pressão seletiva para disseminação de cepas resistentes aos carbapenêmicos. Esse efeito pode ser explicado pelo processo evolutivo no qual podem favorecer a predominância, em uma determinada população bacteriana, de fenótipos resistentes aos carbapenêmicos, derivados de fenômenos como mutações pontuais, conjugação, recombinação, transposição e integração de elementos genéticos (Nikaido 2009).

Esses novos genes podem estar localizados tanto em cromossomos bacterianos como em plasmídeos e/ou transpósons.

1.2 Resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos

Os quatro principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos são:

(1) Produção de β -lactamases: são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, tornando o antimicrobiano inativo antes de atingir seu alvo, as PBPs - proteínas ligadoras de penicilina (Massova and Mobashery 1998);

(2) Alteração de PBP2: quando as proteínas ligadoras de penicilina estão alteradas, há uma menor afinidade pelos antimicrobianos β -lactâmicos (Babic, Hujer et al. 2006);

(3) Falta ou baixa expressão de proteínas de membrana externa (OMPs) em bactérias Gram-negativas: restringe a entrada de alguns antimicrobianos β -lactâmicos no espaço periplasmático (Gootz 2004; Jacoby, Mills et al. 2004);

(4) Hiperexpressão de bombas de efluxo.

As β -lactamases representam o mecanismo de resistência predominante da resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos, tanto em isolados hospitalares quanto comunitários, o que é em parte facilitado por sua eficiência catalítica, dada a localização dessas enzimas no espaço periplasmático (Bush 2001; Babic, Hujer et al. 2006).

1.3 Enzimas β -lactamases

As enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores expressam genes de β -lactamases (*bla*) localizados no cromossomo bacteriano, em plasmídeos, ou em transpósons. Normalmente, genes *bla* estão associados à integrons, elementos genéticos de tamanhos variados, que contém um gene integrase conservado (*int*), cassetes gênicos que podem codificar resistência a diferentes classes de antimicrobianos, e um sítio de integração destes cassetes gênicos (*attI*). Integrons não são elementos móveis, por isso, necessitam estar localizados em plasmídeos ou transpósons para sua disseminação (Weldhagen 2004; Bush and Fisher 2011).

Sistemas de nomenclatura para enzimas β -lactamases têm sido baseados na similaridade da sequência de aminoácidos, como proposto por Ambler (Ambler 1980) ou nas características funcionais (substrato e perfil de inibição), como definido por Bush e Jacoby (Figura 2) (Bush and Jacoby 2010; Bush 2013).

Figura 2. Classificação das enzimas β -lactamases. Abreviações: AC - Ácido Clavulânico, EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético. Adaptado de (Bush 2013).

Segundo a classificação de Bush e Jacoby (Bush and Jacoby 2010), as β -lactamases são divididas em duas grandes classes moleculares: 1) as serino-carbapenemases, que interagem com o substrato e formam numa primeira etapa um composto acil pela interação com o resíduo de serina no sítio ativo da enzima; 2) as metalo- β -lactamases (MBL), que contém um ou mais átomos de zinco no sítio ativo, e são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos atualmente disponíveis, exceto os monobactâmicos (Bush and Fisher 2011; Bush 2013).

Representantes da classe A das serino-carbapenemases são as β -lactamases KPC, TEM, SHV, SME, GES, as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), dentre outras (Bush 2013). Mais recentemente, uma nova carbapenemase da classe A, designada “Brazilian *Klebsiella* Carbapenemase” (BKC-1), foi descrita no Brasil. Este gene foi encontrado em baixa frequência em *Klebsiella pneumoniae*, possivelmente pelo fato de estar alocado em um pequeno plasmídeo não conjugativo (Nicoletti, Marcondes et al. 2015; Martins, Cordeiro-Moura et al. 2016).

A classe C de Ambler normalmente está relacionada a genes AmpC, sejam

eles de localização cromossômica ou plasmidial. Algumas espécies bacterianas expressam AmpC constitutivamente, em função da presença do gene no cromossomo, como é o caso do grupo MYSPACE - *Morganella*, *Yersinia*, *Serratia*, *Providencia*, *Aeromonas*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (Jacobs, Joris et al. 1995; Hanson and Sanders 1999).

As β -lactamases da classe D apresentam uma intensa atividade hidrolítica da oxacilina, por isso, receberam a designação de oxacilinases. São encontradas principalmente em *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, mas também têm sido relatadas em *Enterobacteriaceae* (Saavedra, Cayo et al. 2014; Cho, Huh et al. 2015).

1.4 Metallo- β -lactamases (MBLs)

As enzimas da classe B de Ambler (MBLs) são encontradas em *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e uma ampla variedade de *Enterobacteriaceae*. Além de conferirem resistência aos carbapenêmicos, às cefalosporinas e às penicilinas, não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, pois esta inibição ocorre apenas por agentes quelantes de cátions bivalentes, como, por exemplo, o EDTA (Babic, Hujer et al. 2006; Bush and Fisher 2011; Bush 2013).

Os genes que codificam essas enzimas são encontrados em diferentes elementos genéticos, como cromossomos, plasmídeos, transpósons e integrons, potencialmente representando uma ameaça clínica maior do que as enzimas serino-carbapenemases, para as quais recentemente entrou em uso clínico o inibidor avibactam (Patel and Bonomo 2013).

Atualmente, patógenos produtores de metallo- β -lactamases, como VIM

(descrito em Verona, Itália) e IMP (descrito primeiramente no Japão) são encontrados principalmente em surtos no pacífico da Ásia e na Europa (Walsh 2010). Já foram identificadas 51 variantes da enzima *bla_{VIM}* e 58 variantes da enzima *bla_{IMP}*, segundo Jacoby e Bush (Bush, Palzkill et al. 2015).

SPM-1 é a única variante da enzima denominada São Paulo metalo- β -lactamase, com raros relatos de detecção fora do Brasil. Um primeiro caso fora do país descreve a ocorrência em um paciente suíço, inicialmente tratado no Brasil, que apresentou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* produtora de *bla_{SPM-1}* (Salabi, Toleman et al. 2010). A descrição mais recente foi publicada em 2016, e descreve a detecção em 2013, em amostra de orofaringe, em paciente sem histórico de viagem ao Brasil (Hopkins, Meunier et al. 2016).

Em 2009, uma nova MBL foi descrita com características bioquímicas semelhantes às aquelas relatadas nas enzimas IMP-1 e VIM-2, porém com apenas 32% de similaridade à sequência de VIM-1: NDM-1 (New Delhi metalo- β -lactamase). A enzima foi denominada desta forma com base na cidade de origem do primeiro paciente onde se detectou este mecanismo de resistência, sendo que, atualmente já foram identificadas 17 variantes desta enzima (Tabela 1) (Yong, Toleman et al. 2009; Bush, Palzkill et al. 2015).

Tabela 1. Variantes da enzima NDM depositadas no GenBank.

Enzima	Organismo	Ano de isolamento	País	Localização	Depósito	Referência
NDM-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2009	Índia	Plasmídeo	FN396876.1	(Yang, Chen et al. 2012)
NDM-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2011	Egito	Cromossomo	JF703135.1	(Kaase, Nordmann et al. 2011)
NDM-3	<i>Escherichia coli</i>	2010	Austrália	Plasmídeo	JQ734687.1	(Rogers, Sidjabat et al. 2013)
NDM-4	<i>Escherichia coli</i>	2010	Índia	Plasmídeo	JQ348841.1	(Nordmann, Boulanger et al. 2012)
NDM-5	<i>Escherichia coli</i>	2011	Reino Unido	Plasmídeo	JN104597.1	(Hornsey, Phee et al. 2011)
NDM-6	<i>Escherichia coli</i>	2010	Estados Unidos	Plasmídeo	JN967644.1	(Rasheed, Kitchel et al. 2013)
NDM-7	<i>Escherichia coli</i>	2012	Alemanha	Plasmídeo	JX262694.1	(Gottig, Hamprecht et al. 2013)
NDM-8	<i>Escherichia coli</i>	2012	Nepal	Plasmídeo	AB744718.1	(Tada, Miyoshi-Akiyama et al. 2013)
NDM-9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2013	China	Plasmídeo	KC999080.2	(Wang, Li et al. 2014)
NDM-10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2013	Índia	Plasmídeo	KF361506.1	(Khajuria, Praharaj et al. 2016)
NDM-11	<i>Escherichia coli</i>	Não especificado	Índia	Não especificado	KP265939.1	Não publicado
NDM-12	<i>Escherichia coli</i>	2013	Nepal	Plasmídeo	AB926431.1	(Tada, Shrestha et al. 2014)
NDM-13	<i>Escherichia coli</i>	2013	Nepal	Cromossomo	LC012596.1	(Shrestha, Tada et al. 2015)
NDM-14	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Não especificado	China	Plasmídeo	KM210086.1	(Zou, Huang et al. 2015)
NDM-15	<i>Escherichia coli</i>	Não especificado	Índia	Não especificado	KP735848.1	Não publicado
NDM-16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2014	Rússia	Não especificado	KP862821.1	(Kazmierczak, Rabine et al. 2016)
NDM-17	<i>Escherichia coli</i>	Não especificado	China	Plasmídeo	Não depositado	(Liu, Wang et al. 2017)

Fonte: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>.

1.5 New Delhi metalo- β -lactamase (NDM)

Patógenos produtores de NDM têm sido popularmente designados de “superbactérias”, pois muitos deles são resistentes a múltiplos antimicrobianos, exceto colistina e, possivelmente, tigeciclina, semelhante a muitos patógenos produtores de *bla*_{KPC-2} (Kumarasamy, Toleman et al. 2010).

O primeiro relato de *bla*_{NDM} ocorreu em um paciente do sexo masculino, 59 anos, com residência na Suécia. Durante viagem à Índia, foi hospitalizado em New

Delhi devido a um abscesso glúteo. Quando transferido para a Suécia, uma cultura de urina evidenciou *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Testes adicionais confirmaram a presença de um novo mecanismo de resistência albergado em um plasmídeo de aproximadamente 180 Kb (Yong, Toleman et al. 2009).

No Brasil, o primeiro relato de *bla_{NDM-1}* descreveu sua detecção em paciente da cidade de Porto Alegre - Rio Grande do Sul, em *Providencia rettgeri* cultivada de um fragmento de tecido de pé diabético infectado (Carvalho-Assef, Pereira et al. 2013). Após a publicação inicial, uma segunda publicação evidenciou a localização cromossômica do gene, baseado em sequenciamento de nova geração (Pereira, Albano et al. 2015). Relatos subsequentes do Brasil evidenciaram a presença do gene *bla_{NDM-1}* em plasmídeos promíscuos (Schultsz and Geerlings 2012; Carvalho-Assef, Pereira et al. 2013; Quiles, Rocchetti et al. 2015).

Dentro de um curto período de tempo, esta enzima foi identificada em diversas regiões do mundo (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Países que identificaram o gene *bla_{NDM}*.

País	Continente	Referência
Afganistão	Ásia	(McGann, Hang et al. 2012)
África do Sul	África	(Lowman, Sriruttan et al. 2011)
Alemanha	Europa	(Gottig, Pfeifer et al. 2010)
Arábia Saudita	Ásia	(Zowawi, Sartor et al. 2014)
Argélia	África	(Boulanger, Naas et al. 2012)
Argentina	América	(Montana, Cittadini et al. 2016)
Austrália	Oceania	(Poirel, Lagrutta et al. 2010)
Áustria	Europa	(Zarfel, Hoenigl et al. 2011)
Bélgica	Europa	(Bogaerts, Bouchahrouf et al. 2011)
Brasil	América	(Carvalho-Assef, Pereira et al. 2013)
Bulgária	Europa	(Poirel, Savov et al. 2014)
Camarões	África	(Dortet, Poirel et al. 2012)
Canadá	América	(Peirano, Pillai et al. 2011)
Catar	Ásia	(Zowawi, Sartor et al. 2014)
China	Ásia	(Chen, Zhou et al. 2011)

Continuação...

País	Continente	Referência
Cingapura	Ásia	(Koh, Khoo et al. 2010)
Colômbia	América	(Escobar Perez, Olarte Escobar et al. 2013)
Coréia do Sul	Ásia	(Sung, Koo et al. 2015)
Croácia	Europa	(Mazzariol, Bosnjak et al. 2012)
Cuba	América	(Quinones, Carvajal et al. 2015)
Dinamarca	Europa	(Hammerum, Toleman et al. 2010)
Egito	África	(Hrabak, Stolbova et al. 2012)
Emirados Árabes	Ásia	(Ghazawi, Sonnevend et al. 2012)
Equador	América	(Zurita, Parra et al. 2015)
Espanha	Europa	(Sole, Pitart et al. 2011)
Eslováquia	Europa	(Schreterova, Takacova et al. 2014)
Estados Unidos	América	(CDC 2010)
Etiópia	África	(Pritsch, Zeynudin et al. 2017)
Filipinas	Ásia	(Chou, Roa et al. 2016)
Finlândia	Europa	(Osterblad, Kirveskari et al. 2012)
França	Europa	(Birgy, Doit et al. 2011)
Grécia	Europa	(Giakkoupi, Tryfinopoulou et al. 2013)
Guatemala	América	(Pasteran, Albornoz et al. 2012)
Honduras	América	(Waterman, McGann et al. 2013)
Hong Kong	Ásia	(Ho, Lo et al. 2011)
Iémen	Ásia	(Gharout-Sait, Alsharapy et al. 2014)
Índia	Ásia	(Kumarasamy, Toleman et al. 2010)
Indonésia	Ásia	(Karuniawati, Saharman et al. 2013)
Irlanda	Europa	(McDermott, Morris et al. 2012)
Israel	Ásia	(Gefen-Halevi, Hindiye et al. 2013)
Itália	Europa	(D'Andrea, Venturelli et al. 2011)
Jamaica	América	(Thoms-Rodriguez, Mazzulli et al. 2016)
Japão	Ásia	(Nakazawa, Li et al. 2013)
Kuwait	Ásia	(Jamal, Rotimi et al. 2012)
Líbano	Ásia	(Rafei, Dabboussi et al. 2014)
Malásia	Ásia	(Hamzan, Yean et al. 2015)
Marrocos	África	(Poirel, Benouda et al. 2011)
México	América	(Barrios, Garza-Ramos et al. 2013)
Nepal	Ásia	(Tada, Miyoshi-Akiyama et al. 2013)
Nigéria	África	(Ogbolu and Webber 2014)
Noruega	Europa	(Samuelsen, Thilesen et al. 2011)
Nova Zelândia	Oceania	(Williamson, Freeman et al. 2013)
Paquistão	Ásia	(Kumarasamy, Toleman et al. 2010)
Paraguai	América	(Pasteran, Mora et al. 2014)
Polônia	Europa	(Fielt, Baraniak et al. 2014)

Continuação...

País	Continente	Referência
Portugal	Europa	(Manageiro, Sampaio et al. 2015)
Quênia	África	(Poirel, Revathi et al. 2011)
Reino Unido	Europa	(Kumarasamy, Toleman et al. 2010)
República Checa	Europa	(Nemec and Krizova 2012)
Romênia	Europa	(Szekely, Damjanova et al. 2013)
Rússia	Ásia	(Barantsevich, Churkina et al. 2013)
Sérvia	Europa	(Jovcic, Lepsanovic et al. 2014)
Singapura	Ásia	(Chan, Poon et al. 2011)
Sri-Lanka	Ásia	(Hall, Corea et al. 2014)
Suécia	Europa	(Kumarasamy, Toleman et al. 2010)
Suíça	Europa	(Poirel, Schrenzel et al. 2011)
Tailândia	Ásia	(Rimrang, Chanawong et al. 2012)
Taiwan	Ásia	(Wu, Chen et al. 2010)
Tunísia	África	(Ben Nasr, Decre et al. 2013)
Turquia	Ásia	(Poirel, Ozdamar et al. 2012)
Uruguai	América	(Seija, Medina Presentado et al. 2015)
Venezuela	América	(Delgado-Blas, Ovejero et al. 2016)
Vietnã	Ásia	(Isozumi, Yoshimatsu et al. 2012)

Figura 3. Países nos quais bactérias positivas para NDM foram reportadas até abril de 2017.
Mapa desenvolvido no software R Project (Team 2012).

1.6 Contexto genético de *bla*_{NDM}

A propagação de genes entre bactérias pode ser mediada por transformação, transdução ou transferência de plasmídeo conjugativo (Sykes 2010).

A rápida dispersão de genes de resistência, entre gêneros e espécies bacterianas, via plasmídeos, é uma grande ameaça à saúde humana, pois limita extremamente o número de opções terapêuticas. Na maioria dos países o problema tem grande impacto na terapia empírica de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde, em função das altas taxas de resistência observadas em patógenos hospitalares (Normark and Normark 2002; Eggleston, Zhang et al. 2010; Gillings 2013; Pereira, Marra et al. 2013; Perry and Wright 2013).

Plasmídeos são elementos genéticos com sistema de controle de replicação independentemente do DNA cromossômico. Os plasmídeos podem ser classificados em dois grandes grupos principais: conjugativos e não conjugativos. Os conjugativos apresentam em seu arcabouço genes que codificam toda a maquinaria necessária para sua própria transferência, e isso é extremamente importante para a troca de genes entre bactérias de diferentes classes ou filogeneticamente distantes. Esse processo de transferência horizontal é denominado conjugação (Dionisio, Matic et al. 2002; Grohmann, Muth et al. 2003; de la Cruz, Frost et al. 2010; Smillie, Garcillan-Barcia et al. 2010).

A aquisição de genes de resistência por transferência horizontal entre bactérias é um mecanismo que ocorre naturalmente nos diferentes microbiomas. Quando somado à pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos, atua como uma eficiente ferramenta de sobrevivência de patógenos, particularmente os bacilos Gram-negativos, na qual a resistência a múltiplos antibióticos é principalmente

transferida por plasmídeos (Barlow 2009; Mathers, Cox et al. 2011).

Investigações moleculares envolvendo tanto a caracterização de bactérias produtoras de NDM quanto a caracterização de seus plasmídeos mostram um quadro altamente complexo, pois *bla*_{NDM} foi encontrada em grande variedade de espécies e gêneros de bactérias Gram-negativas e em uma diversidade de clones em uma mesma espécie (Johnson and Woodford 2013). Os plasmídeos codificando NDM são altamente heterogêneos em tamanho, grupo de incompatibilidade e genes de resistência a antimicrobianos (Carattoli 2013; Johnson and Woodford 2013; Campos, da Silva et al. 2015).

O gene *bla*_{NDM} tem sido comumente encontrado em plasmídeos de enterobactérias e de diferentes espécies de *Acinetobacter* spp. (Fu, Du et al. 2012; Yang, Chen et al. 2012; Johnson and Woodford 2013; Pilonetto, Arend et al. 2014; Campos, da Silva et al. 2015; Chagas, Carvalho-Assef et al. 2015).

Em alguns isolados de *A. baumannii*, reportados na literatura, o gene *bla*_{NDM} está localizado no cromossomo, normalmente inserido entre duas repetições diretas da sequência de inserção *ISAba125*, formando um transpóson composto Tn125 (Karthikeyan, Thirunarayan et al. 2010; Espinal, Fugazza et al. 2011; Kaase, Nordmann et al. 2011; Pfeifer, Wilharm et al. 2011; Bogaerts, Rezende de Castro et al. 2012; Bonnin, Poirel et al. 2012; Boulanger, Naas et al. 2012; Hrabak, Stolbova et al. 2012; Poirel, Bonnin et al. 2012). A sequência de inserção *ISAba125* pode se apresentar de diferentes formas, conforme demonstrado na Figura 4 (Toleman, Spencer et al. 2012).

Figura 4. Informações da sequência encontrada anteriormente ao gene *bla_{NDM-1}*, em diferentes espécies bacterianas, em diferentes regiões geográficas. As setas indicam a direção da transcrição. Adaptado de (Toleman, Spencer et al. 2012).

Investigações do ambiente genético de *bla_{NDM}* em isolados de *A. baumannii* e enterobactérias revelaram a presença de um novo gene de resistência designado *ble_{MBL}* (gene *ble* associado com a metalo- β -lactamase NDM), que causa resistência à bleomicina, pertence à família dos glicopeptídeos produzidos por *Streptomyces verticillus* que possui propriedades antibacterianas, sendo também utilizado em quimioterapia de câncer. Os genes *bla_{NDM}* e *ble_{MBL}* são expressos pelo mesmo promotor localizado anteriormente ao gene *bla_{NDM}* na extremidade *ISAba125* (Figura 5) (Dortet, Nordmann et al. 2012).

Figura 5. Ambiente genético de *bla*_{NDM-1} e *ble*_{MBL}. Adaptado de (Dortet, Nordmann et al. 2012).

Em termos do surgimento inicial de NDM em patógenos humanos, há a hipótese de que o pareamento de *bla*_{NDM} e *ble*_{MBL} pode ter sido integrado primeiramente no cromossomo de *Acinetobacter baumannii* a partir de uma espécie ambiental desconhecida, na qual se associou com ISAb₁₂₅ e, em seguida, foi transposto em plasmídeos capazes de replicação e transferência conjugativa em enterobactérias, com uma cópia a jusante e outra a montante do elemento de inserção ISAb₁₂₅, sendo este posteriormente perdido em alguns isolados (Nordmann, Dortet et al. 2012; Toleman, Spencer et al. 2012). O mecanismo pelo qual ocorreu a transferência dos genes *bla*_{NDM} de *Acinetobacter* para *Enterobacteriaceae* ainda não está elucidado.

Em *Pseudomonas aeruginosa*, foi descrito um novo ambiente genético, contendo duas cópias de *bla*_{NDM-1}, o que demonstra a complexidade e a diversidade de dispersão deste gene (Figura 6) (Jovcic, Lepsanovic et al. 2013).

Figura 6. Diferentes ambientes genéticos de bla_{NDM-1} em enterobactérias, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Jovcic, Lepsanovic et al. 2013).

1.7 Dados nacionais de bla_{NDM}

Os primeiros casos de resistência a antimicrobianos em bacilos Gram-negativos no Brasil, descritos no PubMed, estão restritos a infecções adquiridas na comunidade e datados de 1968 (Sampaio and Gales 2016).

Nova Delhi metalo- β -lactamase (NDM) foi descrita primeiramente no Brasil em 2013, em um isolado de *Providencia rettgeri*, de um paciente com pé diabético, em Porto Alegre. Após sequenciamento de nova geração, observou-se que o gene bla_{NDM-1} está inserido em um transpóson composto Tn125 (10.092 pb) (Carvalho-Assef, Pereira et al. 2013). Posteriormente, este isolado mostrou ter resistência heterogênea aos carbapenêmicos, o que pode tornar sua detecção desafiadora

(Zavascki, Falci et al. 2014).

Comparando o que ocorreu com a enzima KPC, na qual foi detectada no Brasil 10 anos após sua descrição inicial, isolados produtores de NDM-1 foram detectados previamente, o que indica um grande potencial para uma disseminação mais eficiente (Sampaio and Gales 2016).

Subsequentemente, a expressão de NDM-1 foi reportada em *Enterobacter hormaechei*, na mesma cidade que o primeiro isolado foi detectado (Carvalho-Assef, Pereira et al. 2014).

Outro grupo de Porto Alegre reportou a existência de isolados do Complexo *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* e *Acinetobacter pittii* expressando o gene *bla_{NDM-1}*. No isolado de *Acinetobacter pittii*, o gene encontra-se, provavelmente, no cromossomo bacteriano, em um transpóson Tn125 truncado, e pertence ao complexo clonal ST119 (Rozales, Ribeiro et al. 2014; Pagano, Poirel et al. 2015).

Em Londrina – PR, *Acinetobacter baumannii bla_{NDM-1}* foi isolado de amostra de urina, de um paciente de 71 anos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Análises indicaram que o gene encontra-se em um plasmídeo de aproximadamente 100 Kb e o isolado pertence ao complexo clonal ST25 (Pillonetto, Arend et al. 2014).

A seguir, coproduções de NDM-1 e KPC-2 foram descritas em *Providencia rettgeri*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, no Rio de Janeiro (Pereira, Borghi et al. 2015; Quiles, Rocchetti et al. 2015; Aires, Pereira et al. 2017).

Em *Acinetobacter bereziniae* foi observado um transpóson Tn125 albergando o gene *bla_{NDM-1}* em um plasmídeo de 41 Kb (Chagas, Carvalho-Assef et al. 2015). Posteriormente, outro artigo demonstrou sucesso terapêutico para infecção por *Acinetobacter* spp. produtor de NDM-1 em um paciente jovem e sem comorbidades

(Schuelter-Trevisol, Schmitt et al. 2016).

Providencia rettgeri e *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*, isolados no Rio Grande do Sul) e *Klebsiella pneumoniae*, isolada no Rio de Janeiro, também possuem o gene *bla*_{NDM-1}, porém, apenas no primeiro isolado foi observado um transpóson Tn125 contendo duas cópias da sequência de inserção ISAba125 (Pereira, Albano et al. 2015).

Em fevereiro de 2017, Aires e colaboradores descreveram três isolados de *Klebsiella* spp. de complexos clonais diferentes, provenientes de um mesmo hospital em Campos dos Goytacazes – RJ. Após sequenciamento completo dos genomas, verificou-se que o gene *bla*_{NDM-1} está associado ao transpóson Tn3000. Este achado reforça a proposta de nosso grupo que o elemento genético móvel Tn3000 tenha um papel fundamental na disseminação de *bla*_{NDM-1}, devido a este gene ser encontrado em plasmídeos de diferentes tamanhos (Aires, Pereira et al. 2017).

Posteriormente, um homem de 55 anos, foi admitido em hospital em São Paulo para amputação do 4º dedo do pé devido a complicações de osteomielite. Cultura de osso, após amputação, revelou a presença de *Providencia rettgeri* albergando o gene *bla*_{NDM-1} (Carmo Junior, Filho et al. 2015). No mesmo estado, na cidade de Jaú, outro paciente (72 anos) foi admitido com câncer de próstata metastático, onde uma amostra de urina evidenciou a presença de *Klebsiella pneumoniae bla*_{NDM-1} (Ferreira, Mondelli et al. 2016).

Amostras de *Klebsiella pneumoniae bla*_{NDM-1} foram isoladas na Praia do Flamengo e na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro, em projetos de monitoramento de ocorrência de resistência bacteriana em águas costeiras. O artigo de Campana e colaboradores mostrou que o isolado pertence ao complexo clonal ST11 e o gene está albergado em um plasmídeo conjugativo IncA/C de

aproximadamente 120 Kb, que também carrega genes de β -lactamase CTX-M-15, TEM-1, SHV-11, OXA-1 e CMY-6 (de Araujo, Silva et al. 2016; Campana, Montezzi et al. 2017).

O trabalho mais recente publicado no Brasil, até o momento, mostra o gene *bla_{NDM-1}* em diferentes espécies bacterianas, em plasmídeos de tamanhos distintos, variando de aproximadamente 52 a 154 Kb, o que demonstra a plasticidade destes elementos genéticos móveis em disseminar resistência (Rozales, Magagnin et al. 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A rapidez com a qual um novo mecanismo de resistência pode emergir em bactérias capazes de causar infecções graves e se disseminar tornando-se um problema de saúde pública está claramente exemplificada pelas carbapenemases do tipo NDM.

Os elementos genéticos móveis em que residem podem ser transferidos entre espécies e gêneros bacterianos distintos, podendo carrear também determinantes de resistência para outras classes de antimicrobianos.

O sequenciamento dos plasmídeos e cromossomos com *bla*_{NDM} representa uma oportunidade única para o entendimento de como ocorre a disseminação desse mecanismo de resistência no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o contexto dos genes *bla*_{NDM} em bacilos Gram-negativos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar como ocorre a transferência do gene *bla*_{NDM-1} entre os isolados da primeira amostra (E0083033);
- Avaliar a eficiência de transposição do Tn3000;
- Determinar como ocorre a transferência do gene *bla*_{NDM-1} entre os isolados de uma mesma amostra de swab retal (E8162888);
- Verificar se os isolados de *Enterobacter hormaechei* subsp. “*steigerwaltii*” (E0083033) e *Enterobacter hormaechei* subsp. “*oharae*” (E8162888) possuem o mesmo plasmídeo;
- Determinar o contexto genético nos quais estão inseridos os gene *bla*_{NDM} em isolados de *Acinetobacter radioresistens*, *A. ursingii* e *A. guillouiae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados Bacterianos

Foram selecionados os primeiros 28 bacilos Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos que albergam o gene *bla_{NDM}* cultivados de pacientes atendidos pelo Fleury Medicina e Saúde, de agosto/2013 a abril/2015 (Tabela 3). Estes isolados foram previamente detectados por teste fenotípico e PCR para o gene NDM. As amostras foram repicadas em ágar MacConkey (Difco) para avaliação de sua pureza e congeladas para armazenamento a -70°C em caldo LB contendo 20% de glicerol.

Nenhum dos pacientes descritos na Tabela 3 tiveram histórico de viagem ao exterior nos últimos seis meses anteriores à coleta da amostra.

Tabela 3. Amostras utilizadas neste estudo.

Amostras	Nº do isolado	Paciente	Sexo	Data da coleta	Amostra clínica	Espécie bacteriana	Cidade/Estado	Hospital
1	E0083033-1	A	F	09/08/2013	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii</i>	Rio de Janeiro/RJ	1
2	E0083033-2	A	F	09/08/2013	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	1
3	E2143152	B	F	10/09/2013	Swab retal	<i>Citrobacter freundii</i>	Rio de Janeiro/RJ	2
4	E2143165	C	M	26/09/2013	Urina	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
5	E2243477	D	M	15/10/2013	Urina	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
6	E3281689	E	F	23/11/2013	Urina	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
7	E3292745	F	F	23/11/2013	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
8	E3263934	G	M	26/11/2013	Swab retal	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Santo André/SP	4
9	E4171834	H	M	11/12/2013	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
10	E4171835	H	M	13/12/2013	Hemocultura	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
11	E5021268	I	F	27/12/2013	Hemocultura	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
12	E5031746	J	M	30/12/2013	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
13	E5131942	K	M	13/01/2014	Swab retal	<i>Acinetobacter ursingii</i>	Santo André/SP	4
14	05196524	L	F	01/09/2014	Urina	<i>Escherichia coli</i>	Brasília/DF	5
15	E6192100	M	F	20/02/2014	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
16	E8103204	M	F	11/04/2014	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
17	E8152841	N	M	10/04/2014	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
18	E8162888-1	O	M	10/04/2014	Swab retal	<i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
19	E8162888-2	O	M	10/04/2014	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	3
20	F0202639	P	M	13/06/2014	Sec. traqueal	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Porto Alegre/RS	6
21	F5280088	Q	F	27/11/2014	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Salvador/BA	7
22	F8203169	R	F	12/02/2015	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	8
23	F8203175-1	S	F	12/02/2015	Swab retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rio de Janeiro/RJ	8
24	F8203175-2	S	F	12/02/2015	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	8
25	F9113300	Q	F	11/03/2015	Hemocultura	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Salvador/BA	7
26	F9092340	S	F	12/02/2015	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	8
27	F9072633	S	F	25/02/2015	Swab retal	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro/RJ	8
28	F9112796	Q	F	11/03/2015	Urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Salvador/BA	7

4.2 Identificação Bacteriana

Identificação fenotípica das espécies foi realizada por espectrometria de massas utilizando-se Vitek MS® (bioMérieux), conforme recomendado pelo fabricante.

Identificação molecular foi realizada por sequenciamento parcial do gene *gyrB*, como previamente descrito (Fukushima, Kakinuma et al. 2002) (Tabela 4). A identificação de *Enterobacter* em nível de espécie foi realizada por sequenciamento parcial do gene *hsp60* como previamente descrito (Hoffmann and Roggenkamp 2003; Hoffmann, Stindl et al. 2005) (Tabela 4). A Platinum® Taq DNA Polymerase foi utilizada nas reações de PCR e sequenciamento de Sanger foi realizado utilizando-se BigDye Terminator version 3.1 e 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acordo com as instruções dos fabricantes. Contigs foram alinhados utilizando o programa DNABaser version 3.4.5 (Heracle Biosoft) e subsequentemente comparados com as sequências depositadas no GenBank através do programa BLAST.

Tabela 4. Primers utilizados neste estudo.

Nome do primer	Sequência do primer 5'-3'	Tamanho do fragmento	Alvo	Ciclo de amplificação	Referência
UP1S	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	1.171 pb	<i>gyrB</i>	30X: 95°C - 1 min., 60°C - 1 min., 72°C - 2 min. 72°C - 5 min.	(Fukushima, Kakinuma et al. 2002)
UP2Sr	AGCAGG GTACGGATGTGCGAGCC				
Hsp60-F	GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC	341 pb	<i>hsp60</i>	35X: 94°C - 40s, 59°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Hoffmann and Roggenkamp 2003)
Hsp60-R	ATGCATTCTGGTGGTGATCATCAG				
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC*	232 pb	<i>bla_{IMP}</i>	35X: 94°C - 40s, 55°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Poirel, Walsh et al. 2011)
IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC*				
VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	390 pb	<i>bla_{VIM}</i>	35X: 94°C - 40s, 55°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Poirel, Walsh et al. 2011)
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG				
KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798 pb	<i>bla_{KPC}</i>	35X: 94°C - 40s, 57°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Poirel, Walsh et al. 2011)
KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG				
SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271 pb	<i>bla_{SPM}</i>	35X: 94°C - 40s, 57°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Maiwald 2004)
SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG				
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438 pb	<i>bla_{OXA-48}</i>	35X: 94°C - 40s, 57°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Maiwald 2004)
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG				
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621 pb	<i>bla_{NDM}</i>	35X: 94°C - 40s, 55/57°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Maiwald 2004)
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC				
rrs 27 FW	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG**	1.465 pb	16S rRNA	35X: 94°C - 40s, 55/57°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	(Maiwald 2004)
rrs 1492 RV	GGTTACCTTGTTACGACTT				

*Y = C ou T; ** M = A ou C.

Continuação...

Nome do primer	Sequência do primer 5'-3'	Tamanho do fragmento	Alvo	Ciclo de amplificação	Referência
NDM-L-Bleo	TGGGTCGAGGTCAGGATAGG	1.110 pb	<i>bla</i> _{NDM-1}	94°C - 10 min. 30X: 94°C - 40s, 62°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
NDM-R-Aba125	GCTTTTGAAACTGTGCGCACCT				
Tn3000-34232-13FW	GGGGCAGTTCAGACGAAGAA	6.073 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 5 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
Tn3000-28160-79RV	ATGAAAGCCGGGATTTCAGCA				
Tn3000-dsbD31638-19-RV	CTCGGGTGAAGTCGGGAAAA	3.478 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 3 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
Tn3000-28160-79RV	ATGAAAGCCGGGATTTCAGCA				
Tn3000-ndm33418-399-FW	GGCCAGCAAATGGAAACTGG	2.761 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 3 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
Tn3000-dsbD30657-75-FW	ATGACCGCATCCACGATCC				
Tn3000-34232-13FW	GGGGCAGTTCAGACGAAGAA	1.452 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 2 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
Tn3000-ndm32781-800-RV	ATCACGATCATGCTGGCCTT				
meth-IS3000-38627-08FW	AGCTGCTGTTCCCTTCCTGTG	3.168 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 3 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
meth-IS3000-35460-79RV	TTTTTCGCCAATGTTCCCCG				
meth-IS3000-37263FW	CCAGTCATTGCCAAACGCAG	515 pb	Tn3000	94°C - 10 min. 35X: 94°C - 40s, 56°C - 40s, 72°C - 1 min. 72°C - 7 min.	Este trabalho
meth-IS3000-36748RV	ATGAAAGCCGGGATTTCAGCA				

*Y = C ou T; ** M = A ou C.

4.3 Extração de DNA genômico pelo método de lise térmica

As extrações de DNA genômico foram preparadas a partir de crescimento bacteriano obtido em ágar LB (Invitrogen), após 18 a 24 horas de incubação a 36°C $\pm$ 1°C. As suspensões bacterianas foram preparadas pegando-se uma alça de 1 μ L cheia de células bacterianas em 100 μ L de água ultrapura. A suspensão foi fervida por 10 minutos e congelada a -20°C por 10 minutos. Para amplificação do DNA, as extrações foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min e, em seguida, mantidas a -80°C.

4.4 Detecção de genes codificando carbapenemases e sequenciamento integral do gene *bla*_{NDM}

PCR multiplex para os genes *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM} foram realizados como previamente descrito (Poirel, Walsh et al. 2011), exceto que oligonucleotídeos que amplificam o gene 16S rRNA foram incluídos como controle interno da reação (Maiwald 2004) (Tabela 4).

Para amplificação integral do gene *bla*_{NDM-1}, oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa Primer-BLAST. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se marcador 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida foram corados em Gel Red (Uniscience) por 30 min e visualizados em transiluminador UV.

Os fragmentos foram purificados com Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados com os mesmos oligonucleotídeos utilizando-se BigDye Terminator version 3.1 e 3130x/ Genetic

Analyzer (Applied Biosystems) de acordo com as instruções dos fabricantes. Os contigs foram alinhados utilizando-se o programa DNABaser version 3.4.5 (Heracle Biosoft) e subsequentemente comparados com as sequências depositadas no GenBank através do programa BLAST.

4.5 Preparo de células eletrocompetentes

Para preparo de células eletrocompetentes (BIO-RAD), foram inoculados 2,5 mL de uma cultura overnight da cepa *Escherichia coli* TOP10 em 250 mL de caldo LB (Invitrogen). As células foram crescidas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,5-0,7A. As células foram resfriadas em gelo por cerca de 20 min e quatro alíquotas de 45 mL foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 15 min a 4°C .

Após descartar os sobrenadantes, os pellets foram ressuspensos em 45 mL de água gelada contendo 10% glicerol. Os tubos foram centrifugados e novamente os pellets ressuspensos em 22,5 mL de água gelada com glicerol.

Os tubos foram centrifugados e 2 mL de água gelada com glicerol foram adicionados. Os pellets foram ressuspensos cuidadosamente, centrifugados e os sobrenadantes descartados. Adicionou-se 1 mL de água gelada com glicerol em cada tubo para concentrar a solução bacteriana e os tubos foram centrifugados.

O pellet foi ressuspensos em 1 mL de água gelada com glicerol e foram preparadas alíquotas de 50 μL em microtubos de 1,5 mL. As células foram armazenadas a -80°C para permanecerem estáveis até o momento de uso.

Para verificação da eficiência das células eletrocompetentes, o plasmídeo pUC19 foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10.

4.6 Extração de DNA plasmidial de *Enterobacteriaceae*

Os isolados foram cultivados em ágar LB (Invitrogen) e incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Colônias isoladas foram transferidas para tubo contendo 5 mL de caldo LB (Invitrogen) e incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ overnight.

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o método de lise alcalina descrito por Birnboim & Doly (Birnboim and Doly 1979) com modificações descritas por Sambrook e Russell (Sambrook and Russell 2001). Uma alíquota de 1,5 mL de cultura foi submetida à centrifugação de $16.000 \times g$ por 30 seg. a 4°C , o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspense em 100 μL de solução I (20 mg/mL lisozima, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl – pH 8,0). Adicionou-se 200 μL de solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS) e o tubo foi homogeneizado por inversão. Após exatos 5 min de incubação a 0°C , 150 μL de solução III gelada (3 M acetato de sódio – pH 4,8) foi adicionada e o tubo foi homogeneizado por inversão para precipitação do DNA cromossômico. Incubou-se a 0°C por 5 min, centrifugou-se a $16.000 \times g$ por 5 min a 4°C e transferiu-se 250 μL do sobrenadante para um microtubo limpo de 1,5 mL, onde o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado. Após uma incubação a -20°C por 30 min, o precipitado foi coletado por centrifugação a $16.000 \times g$ por 2 min a 4°C . Posteriormente, o sedimento foi ressuspense em 100 μL de solução IV gelada (0,1 M acetato de sódio/ 0,05 M Tris-HCl - pH 8,0) e o DNA precipitado com 200 μL de etanol absoluto gelado. O tubo foi incubado a -20°C por 10 min para ser coletado por centrifugação. O sedimento foi ressuspense em 30 μL de TE buffer. A concentração de DNA plasmidial foi quantificada utilizando-se um Nanodrop® e as extrações foram armazenadas a -80°C .

4.7 Extração de DNA plasmidial de *Acinetobacter* spp.

Os isolados foram cultivados em ágar LB (Invitrogen) e incubados a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas.

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o método descrito por Hartstein e colaboradores (Hartstein, Morthland et al. 1989; Hartstein, Morthland et al. 1990) com modificações de Tognim e colaboradores (Tognim, Gaziri et al. 1998). Colônias de ¼ da placa de ágar foram transferidas para tubo (2 mL) contendo 1 mL de solução 2,5 M NaCl, 10 mM EDTA - pH 8,0, que foram submetidas à centrifugação de 6.000 x g por 10 min a 20°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspenso em 900 µL de solução sacarose 20%, 50 mM Tris, 10 mM EDTA – pH 8,0). Adicionou-se 200 µL de lisozima (10 mg/mL) e o tubo foi incubado a 37°C por 30 min. Foi adicionado 500 µL de solução 2,5 M NaCl, 10 mM EDTA - pH 8,0, 250 µL de ATAB 0,5% e 50 µL de Triton X-100 10%. O tubo foi homogeneizado por inversão para precipitação do DNA cromossômico e incubado a 56°C por 15 min. Centrifugou-se a 21.000 x g por 45 min a 20°C e transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um microtubo limpo de 2 mL, onde o DNA plasmidial foi lavado duas vezes com 1 mL de álcool fenol-clorofórmio-isoamílico (25:24:1) para eliminar as proteínas. Os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 5 min a 4°C e o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de isopropanol gelado. Após uma incubação overnight a -20°C, o precipitado foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 20 min a 4°C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 30 µL de TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA – pH 7,9). A concentração de DNA plasmidial foi quantificada utilizando-se um Nanodrop® e as extrações foram armazenadas a -80°C.

4.8 Transformação em *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação

Para a eletroporação (BIO-RAD) dos plasmídeos extraídos em *Escherichia coli* TOP10, foram adicionados 3 µL do DNA plasmidial em 50 µL da alíquota da célula eletrocompetente. Homogeneizou-se cuidadosamente a suspensão e incubou-se em gelo por aproximadamente 1 min. Foram transferidos 40 µL desta suspensão para a cubeta de 0,1 cm procedendo a eletroporação a 1,8 kV. Adicionou-se 1 mL de meio SOC na cubeta, e transferiu-se a suspensão para um microtubo limpo de 1,5 mL que foi incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 h a 100 rpm. Foram inoculados 50 µL em cada placa de ágar LB (Invitrogen) contendo 4 µg/mL de ceftazidima. A presença do gene *bla*_{NDM} nos transformantes foi confirmada por PCR.

4.9 Ensaios de conjugação

Foi utilizada a metodologia descrita por Claire A. Woodall, com pequenas modificações (Casali and Preston 2003).

O isolado bacteriano selvagem e a cepa *Escherichia coli* J53 foram repicados em caldo LB (Invitrogen) a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ overnight, separadamente. As suspensões foram diluídas 1:100 em caldo LB. Quando os isolados atingiram a concentração de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.6-0.8A, foram acrescentados 900 µL da suspensão da célula doadora e 100 µL da suspensão da cepa *E. coli* J53 (receptora) em microtubo de 1,5 mL e este foi centrifugado a $16.000 \times g$ a 4°C por 2 min. O sobrenadante foi removido, adicionou-se 100 µL de caldo LB e homogeneizou-se o tubo.

Foram inoculados 100 µL da suspensão de conjugação sobre uma membrana de 0,45 µm colocada sob uma placa de ágar LB e a placa foi incubada a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

por 18 a 24 h.

A membrana foi removida da placa e colocada em um tubo cônico de 50 mL que continha 5 mL de caldo LB. Homogeneizou-se o tubo em vórtex e inoculou-se 50 µL em cada placa de ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima e 125 µg/mL de azida sódica. A presença do gene *bla*_{NDM-1} nos transconjugantes foi confirmada por PCR (Poirel, Walsh et al. 2011).

Para verificação da frequência de conjugação, a suspensão de conjugação foi diluída 1:10 em 12 microtubos e 10 µL de cada diluição foi inoculada em placas de ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima e 125 µg/mL de azida sódica e em placas de ágar LB contendo apenas a azida sódica (controle).

Foi realizada a contagem de colônias de cada placa, calculou-se a média e multiplicou-se pela potência utilizada na placa e pelo volume semeado nesta, ajustando-o para 1 mL. Enfim, para calcular a frequência de conjugação, dividiu-se o total de UFC/mL da amostra pela UFC/mL do controle.

4.10 Perfil plasmidial dos isolados bacterianos selvagens, transformantes e transconjugantes

A estimativa do tamanho plasmidial foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 0,7% utilizando-se uma curva obtida por plotagem da distância (mm) da origem em papel semilogarítmico dos tamanhos plasmidiais da cepa controle *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (154 kb; 66,2 kb; 37,6 kb e 7,4 kb) (Macrina, Kopecko et al. 1978).

4.11 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Os isolados selvagens, transformantes e transconjugantes foram avaliados quanto ao seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos pelas técnicas de microdiluição em caldo (CLSI 2012) utilizando-se caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (Becton-Dickinson) e fitas de Etest para fosfomicina e aztreonam.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas para amicacina, tobramicina, gentamicina, kanamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, ceftazidima, cefoxitina, ceftriaxona, cefepima, imipenem, meropenem, ertapenem, ampicilina, polimixina B, tigeciclina, cloranfenicol e rifampicina.

Foram realizadas as CIMs para as cepas *Escherichia coli* TOP10 - utilizada como célula eletrocompetente para transformação bacteriana – e *Escherichia coli* J53 (resistente à azida sódica) – utilizada no ensaio de conjugação.

Foi utilizada a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle de qualidade desta metodologia e os dados foram analisados baseando-se no Documento M100-S24 do CLSI (CLSI 2014).

4.12 Teste fenotípico para verificação da funcionalidade de *bla*_{OXA-30}

Para verificar a atividade do gene *bla*_{OXA-30} no pEc2A foi realizado teste fenotípico com discos de ampicilina de 10 µg com e sem 10 µL de EDTA 0,1 M. Os diâmetros dos halos foram aferidos (mm) e comparou-se os valores obtidos nos discos com e sem EDTA.

4.13 Eletroforese em Campos Alternados (PFGE)

Para os isolados pertencentes à mesma espécie bacteriana, foi realizada a metodologia de PFGE (Ribot, Fair et al. 2006) para verificação da clonalidade entre as amostras. Para isso, foi realizada uma suspensão bacteriana em um tampão de suspensão de célula (100 mM Tris, 100 mM EDTA), na escala de 3,8 a 4,2 em turbidímetro Densichck (bioMérieux), após crescimento bacteriano de 16 horas em ágar LB (Invitrogen) ou ágar sangue de carneiro a 5% (bioMérieux) em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O tubo foi mantido em gelo para evitar proliferação bacteriana.

Foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL, 15 μL de proteinase K (20 mg/mL) e 300 μL da suspensão bacteriana, sendo que após homogeneização, este foi mantido em banho-maria a 60°C até momento de uso. No mesmo tubo foram adicionados 300 μL de agarose a 1%, mantida a 60°C sendo a suspensão homogeneizada e os blocos preparados com auxílio dos moldes, onde permaneceram por 15 min à temperatura ambiente para completa solidificação.

Os blocos foram transferidos para uma placa de cultura celular de 12 poços contendo 2 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarkosyl – pH 8,0) e 10 μL de proteinase K, e incubados a 54°C por 2 h sob agitação de 160 rpm. Os blocos foram lavados duas vezes com água ultrapura estéril e quatro vezes com tampão TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA - pH 8,0) pré-aquecidos a 54°C , sendo que cada etapa de lavagem ocorreu por 15 min a 54°C sob agitação de 160 rpm.

Os blocos foram cortados ao meio e colocados em placa de cultura celular de 96 poços contendo 200 μL de tampão da enzima 1X, deixando-os por 30 min em temperatura ambiente antes da adição de 3 μL da enzima XbaI (Invitrogen). A placa foi incubada por 4 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O gel de agarose foi dissolvido a 1% e programou-se o CHEF DR III com os seguintes parâmetros: pulso inicial 5 s e final 35 s; duração da corrida 19 h; voltagem 6 V/cm²; ângulo de 120°. Após a corrida, o gel de agarose foi corado em Gel Red (Uniscience) por 30 min e visualizado em transiluminador UV. A comparação dos perfis foi realizada visualmente e utilizando-se o software Bionumerics v.7.5 (Applied Maths®) (Tenover, Arbeit et al. 1995; Bartolleti, Seco et al. 2016).

Foram selecionados para sequenciamento integral dos plasmídeos os isolados que apresentaram perfis de fragmentos distintos.

4.14 Sequenciamento de nova geração de plasmídeos e genomas – Plataforma Illumina

Foi utilizada neste projeto a plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Os plasmídeos foram extraídos dos isolados transformantes (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) e o DNA genômico foi extraído através do kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). Plasmídeos e genomas foram sequenciados separadamente.

4.14.1 Protocolo Nextera DNA

As bibliotecas dos plasmídeos dos transformantes das enterobactérias foram preparadas com o kit *Nextera DNA Library Preparation* (Illumina) conforme as recomendações do fabricante. O sistema comercial *MiSeq Reagent v2 – 500 cycles*

(Illumina) foi utilizado segundo as especificações do fabricante a fim de proceder na etapa de sequenciamento.

4.14.2 Protocolo Nextera XT

As bibliotecas dos genomas dos transformantes das enterobactérias foram preparadas com o kit *Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina) conforme as recomendações do fabricante. O sistema comercial *MiSeq Reagent v3 – 600 cycles* (Illumina) foi utilizado segundo as especificações do fabricante a fim de proceder na etapa de sequenciamento.

4.14.3 Protocolo Mate-Pair

As bibliotecas das amostras de *Acinetobacter* spp. foram preparadas com os kits *Nextera Mate Pair Library Preparation* (Illumina) e *TruSeq DNA Library Preparation* (Illumina), conforme as recomendações do fabricante. O sistema comercial *MiSeq Reagent v3 – 600 cycles* (Illumina) foi utilizado segundo as especificações do fabricante a fim de proceder na etapa de sequenciamento.

4.15 Forma de Análise dos Resultados dos Sequenciamentos

Os genomas e plasmídeos foram montados utilizando-se os programas DNASTar v.2.3.0.131 e Geneious v.8.1.9 e a seguir submetidos a anotação automática utilizando-se o programa Rapid Annotation using System Technology (RAST) v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org/>), seguido de curadoria manual utilizando-se os programas Artemis v.16.0.0 e BioEdit v.7.2.5.

Eventuais discrepâncias foram resolvidas desenhando-se iniciadores com base nas sequências conhecidas e realizando-se reações de PCR. A seguir os amplicons foram sequenciados utilizando-se o método de Sanger. As sequências representativas foram depositadas no GenBank.

4.16 Ensaio de transposição

4.16.1 Clonagem do transpóson Tn3000 em vetor pUC19

As cepas *E. coli* contendo o plasmídeo comercial pUC19 e a cepa *E. coli* E0083033 contendo o pEc2A foram semeadas em caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 4 µg/mL de ceftazidima, respectivamente.

O plasmídeo pUC19 (2.686 pb) foi extraído com auxílio de QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen) e o plasmídeo pEc2A (74.852 pb) por lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001). Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição HindIII (Invitrogen) a 37°C por 1 hora. A seguir a enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. Esta enzima corta o plasmídeo em vários fragmentos, sendo um deles um fragmento de 18.398 pb, albergando o transpóson Tn3000 integral (11.823 pb). Os fragmentos foram ligados com auxílio da enzima T4 ligase (Invitrogen) na temperatura de 2 a 8°C overnight.

A ligação dos plasmídeos foi utilizada para transformação bacteriana por eletroporação em *E. coli* TOP10 (BIO-RAD). A seleção dos transformantes foi realizada em ágar LB (Invitrogen) contendo 4 µg/mL de ceftazidima, 0,5 mM IPTG e 80 µg/mL Xgal.

Os transformantes que apresentaram colônias brancas no *screening blue-*

white foram reisolados em ágar contendo as mesmas concentrações de soluções. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *bla*_{NDM-1} (Poirel, Walsh et al. 2011) e extração de plasmídeo por lise alcalina foram realizadas para confirmação da presença do transpóson Tn3000 como inserto no vetor pUC19 (21.084 pb). Este transformante recebeu o nome de TOP pUC19::Tn3000.

4.16.2 Transformação por eletroporação em *E. coli* DH5α contendo pB10

A cepa *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pB10 (64.508 pb - GenBank NC_004840.1) foi semeada em ágar LB + 30 µg/mL tetraciclina para preparo de célula eletrocompetente (BIO-RAD).

Foi realizada extração de plasmídeo da cepa TOP pUC19::Tn3000 (21.084 pb) com auxílio de QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen) para posterior transformação por eletroporação na cepa *E. coli* DH5α com pB10 (BIO-RAD). A seleção dos transformantes foi realizada em ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima + 30 µg/mL tetraciclina.

Extração de plasmídeo por lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) foi realizada para confirmação da presença de ambos os plasmídeos: pB10 e pUC19::Tn3000. Este transformante recebeu o nome de DH5α pB10 + pUC19::Tn3000.

4.16.3 Transposição por elevação de temperatura

Após o transformante DH5α pB10 + pUC19::Tn3000 ser semeado em ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima + 30 µg/mL tetraciclina foram selecionadas três

colônias para repique em triplicata (A, B e C) em 5 mL de caldo LB, 4 µg/mL de ceftazidima e 30 µg/mL tetraciclina. Os tubos foram incubados a 42°C, sob agitação a 100 rpm, overnight (1° repique).

Foi realizada diluição 1:100 das suspensões bacterianas para 5 mL de caldo LB com 4 µg/mL de ceftazidima e 30 µg/mL tetraciclina e incubação a 42°C, sob agitação a 100 rpm, overnight (2° repique). Este procedimento foi realizado novamente caracterizando o 3° repique.

Extração de plasmídeo por lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) foi realizada para confirmação da transposição do Tn3000 anteriormente albergado no plasmídeo pUC19 para o plasmídeo pB10 (76.331 pb). Esta cepa recebeu o nome de DH5α pB10::Tn3000C.

4.16.4 Conjugação em *E. coli* J53

A cepa *E. coli* J53 foi semeada em ágar LB + 125 µg/mL azida sódica para ensaio de conjugação com a cepa DH5α pB10::Tn3000C (Casali and Preston 2003). A seleção dos transconjugantes foi realizada em ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima, 30 µg/mL tetraciclina e 125 µg/mL azida sódica.

A extração de plasmídeo foi realizada por lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) para confirmação da existência de um único plasmídeo resistente a azida sódica, albergando o Tn3000. Esta cepa recebeu o nome de J53 pB10::Tn3000C. Esta cepa foi sequenciada em plataforma Illumina, conforme descrito no item 4.14.

4.16.5 Sequenciamento da cepa J53 pB10::Tn3000C

O plasmídeo da cepa J53 pB10::Tn3000C foi extraído pelo método de lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) e sequenciado em plataforma Illumina, utilizando protocolo Nextera XT e kit v2 – 500 ciclos.

4.17 Verificação da presença do Tn3000 nos plasmídeos deste estudo

Foi realizada montagem por referência utilizando-se a sequência nucleotídica do Tn3000 com auxílio do software DNASTar v. 2.3.0.131. Os contigs das amostras sequenciadas com a plataforma Illumina foram alinhados para verificar a presença do Tn3000 nestes plasmídeos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação bacteriana e triagem para genes codificando carbapenemases

O equipamento Vitek MS (bioMérieux) identificou os isolados de *Enterobacter* como pertencentes ao complexo *E. cloacae* com 99% de confiança. Quando as sequências parciais do gene *gyrB* (1.171 pb) foram comparadas com as cepas de referência publicadas por Brady *et al.* (Brady, Cleenwerck et al. 2013), foram obtidas altas similaridades (>90%) com a espécie bacteriana *Enterobacter hormaechei* CCUG 27126. As sequências parciais do gene *hsp60* (341 pb) foram analisadas, sendo o primeiro isolado de *Enterobacter* deste trabalho (E0083033-2) pertencente à “subespécie” *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” (DSMZ16691), e os outros doze isolados pertencentes à “subespécie” *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (Tabela 5). Apesar da nomenclatura de subespécie não ser utilizada oficialmente, é uma ferramenta importante para diferenciação entre isolados, conforme demonstrado em nosso trabalho.

Tabela 5. Isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Enterobacter* spp.

Amostras N° do isolado		Espécie bacteriana
1	E0083033-1	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
4	E2143165	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
5	E2243477	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
6	E3281689	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
7	E3292745	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
9	E4171834	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
10	E4171835	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
11	E5021268	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
12	E5031746	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
15	E6192100	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
16	E8103204	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
17	E8152841	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
18	E8162888-1	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>

Quando os isolados selvagens foram testados por PCR multiplex para detecção de genes codificando carbapenemases, todos foram positivos para *bla*_{NDM}, e negativos para os outros genes avaliados. Todos os isolados possuem o gene *bla*_{NDM-1}.

5.2 Eletroforese em Campos Alternados (PFGE)

Os doze isolados de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” foram analisados através da técnica de eletroforese em campos alternados para seleção de plasmídeos para sequenciamento integral. O coeficiente de similaridade Dice foi utilizado, com 1% de otimização e 1% de tolerância. Se levarmos em conta 80% de similaridade, as amostras do Rio de Janeiro apresentaram dois grupos clonais distintos (Figura 7), denominados PFGE 1 e 2.

O grupo clonal PFGE 1 possui dez isolados, sendo três deles 100% similares entre eles. Já o grupo clonal PFGE 2 possui dois isolados. Foram selecionados

quatro isolados do grupo clonal PFGE 1 e um isolado do grupo clonal PFGE 2 para sequenciamento integral dos plasmídeos.

Dos quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae*, três deles foram isolados do mesmo paciente, porém, de amostras clínicas diferentes: swab retal, hemocultura e urina. Após análise do PFGE, verificou-se 100% de similaridade entre estas três amostras.

O mesmo ocorreu com os quatro isolados de *Escherichia coli* do mesmo paciente (amostra de swab retal), que apresentaram 100% de similaridade entre eles.

Foram selecionados um isolado de *Klebsiella pneumoniae* e um isolado de *Escherichia coli* destes pacientes para sequenciamento integral dos plasmídeos.

Figura 7. Perfil de clonalidade das amostras de *Enterobacter hormaechei* “subsp. oharae” isoladas no Rio de Janeiro albergando o gene *bla*_{NDM-1}.

5.3 Perfil plasmidial, ensaios de transformação e conjugação

Os dois primeiros isolados deste trabalho, *E. hormaechei* E0083033-1 e *E. coli* E0083033-2, foram avaliados quanto ao perfil plasmidial (Figura 8) sendo que o isolado selvagem de *Enterobacter* exibiu cinco bandas plasmidiais (≈ 130 Kb, ≈ 90 Kb, ≈ 70 Kb, ≈ 7 Kb e ≈ 6 Kb) enquanto seus transformante e transconjugante mostraram uma banda plasmidial de aproximadamente 90 Kb. O isolado selvagem de *Escherichia coli* exibiu duas bandas plasmidiais (≈ 160 Kb e ≈ 70 Kb) enquanto seus transformante e transconjugante mostraram uma banda plasmidial de aproximadamente 70 Kb.

Figura 8. Perfil plasmidial dos isolados selvagens e seus transformantes. No gel de eletroforese: (1) e (7) Cepa de referência *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (plasmídeos de 154 Kb; 66,2 Kb; 37,6 Kb; 7,4 Kb); (2) Isolado selvagem de *E. hormaechei* E0083033-1 (plasmídeos de ≈ 130 Kb; ≈ 90 Kb; ≈ 70 Kb; ≈ 7 Kb e ≈ 6 Kb); (3) Plasmídeo pEh1A derivado de TF1A (transformante derivado de *E. hormaechei* E0083033-1); (4) Isolado selvagem de *E. coli* E0083033-2 (plasmídeos de ≈ 160 Kb e ≈ 70 Kb); (5) Plasmídeo pEc2A derivado de TF2A (transformante derivado de *E. coli* E0083033-2); (6) Transformante albergando ambos os plasmídeos pEh1A e pEc2A com ≈ 90 Kb e ≈ 70 Kb, respectivamente.

A conjugação ocorreu em uma frequência de $5,3 \times 10^{-1}$ nos experimentos com o isolado *E. hormaechei* E0083033-1 e em uma frequência de $6,0 \times 10^{-1}$ em experimentos com o isolado *E. coli* E0083033-2.

As amostras descritas na tabela 6 foram selecionadas de acordo com alguns critérios para transformação por eletroporação em células de *E. coli* TOP 10 (Figura 9).

Tabela 6. Amostras selecionadas para transformação.

Nº do isolado	Espécie bacteriana	Transformante	Tamanho do plasmídeo	Descrição
E0083033-1	<i>E. hormaechei</i>	TF1A	96.124 pb	Primeira amostra isolada neste trabalho, vinda do Rio de Janeiro
E0083033-2	<i>E. coli</i>	TF2A	74.852 pb	
E2143152	<i>C. freundii</i>	TF3A	~ 140 Kb	Única amostra deste gênero bacteriano
E2143165	<i>E. hormaechei</i>	TF4A	~ 100 Kb	Pertence ao grupo clonal PFGE 1
E3281689	<i>E. hormaechei</i>	TF6A	~ 100 Kb	Pertence ao grupo clonal PFGE 1
E3292745	<i>E. hormaechei</i>	TF7A	~ 140 Kb	Pertence ao grupo clonal PFGE 2
05196524	<i>E. coli</i>	TF14A	~ 170 Kb	Segunda amostra de <i>E. coli</i> , porém de Brasília
E6192100	<i>E. hormaechei</i>	TF15A	~ 100 Kb	Possui 100 % de similaridade com outras amostras no grupo PFGE 1
E8162888-1	<i>E. hormaechei</i>	TF18A	96.164 pb	Amostra com dois gêneros bacterianos distintos
E8162888-2	<i>E. coli</i>	TF19A	96.164 pb	
F5280088	<i>K. pneumoniae</i>	TF21A	~ 200 kb	Primeira amostra deste gênero bacteriano
F8203169	<i>E. coli</i>	TF22A	~ 170 Kb	Terceira amostra de <i>E. coli</i> , porém do Rio de Janeiro
F8203175-1	<i>K. pneumoniae</i>	TF23A	~ 170 Kb	Gêneros bacterianos distintos, isolados do mesmo paciente
F8203175-2	<i>E. coli</i>	TF24A	~ 170 Kb

Figura 9. Perfil plasmidial dos transformantes. No gel de eletroforese: (8) Cepa de referência *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (plasmídeos de 154 Kb; 66,2 Kb; 37,6 Kb; 7,4 Kb); (9) TF3A; (10) TF4A; (11) TF6A; (12) TF7A; (13) TF14A; (14) TF15A; (15) TF18A; (16) TF19A; (17) TF21A*; (18) TF22A; (19) TF23A; (20) TF24A. *Amostra com baixa concentração de DNA plasmidial.

As duas amostras de São Paulo/SP, *Acinetobacter radioresistens* e *Acinetobacter ursingii*, e o *Acinetobacter guillouiae*, proveniente de Porto Alegre/RS, possuem o mesmo plasmídeo de aproximadamente 40 Kb (Figura 10).

Figura 10. Perfil plasmidial de *Acinetobacter* spp. No gel de eletroforese: (21) Cepa de referência *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (plasmídeos de 154 Kb; 66,2 Kb; 37,6 Kb; 7,4 Kb); (22) Cepa de *A. guillouiae* F0202639, contendo um plasmídeo de aproximadamente 40 Kb.

5.4 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os dois primeiros isolados deste trabalho, *E. hormaechei* E00383033-1 e *E. coli* E0083033-2, foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 7) sendo que o isolado selvagem *E. coli* E0083033-2 e seu transformante foram resistentes a todos os β -lactâmicos testados, exceto aztreonam. As CIMs para tobramicina, amicacina, kanamicina, ciprofloxacino e rifampicina no transformante albergando o plasmídeo pEc2A foram 2 a 64 vezes maiores das que observadas para *E. coli* TOP10 sem o plasmídeo, enquanto que não foram observadas elevações da CIM para cloranfenicol e gentamicina.

O transformante obtido com a extração de DNA plasmidial do isolado selvagem *E. hormaechei* E0083033-1 foi resistente a todos os β -lactâmicos testados, exceto aztreonam. Não foram observadas elevações da CIM nos transformantes quando testados aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, rifampicina e cloranfenicol.

Tabela 7. Concentrações inibitórias mínimas para os isolados selvagens e seus transformantes.

Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)				
	E0083033-1	TF1A*	E0083033-2	TF2A**	TOP10®
Ampicilina	≥2056	≥2056	≥2056	≥2056	8
Aztreonam	64	0,094	0,064	0,125	0,094
Cefepima	≥64	32	≥64	≥64	0,06
Cefoxitina	≥1024	512	≥1024	≥1024	8
Ceftazidima	≥64	≥64	≥64	≥64	0,25
Ceftriaxona	≥64	≥64	≥64	≥64	0,06
Ertapenem	64	16	64	16	0,015
Imipenem	64	32	32	32	0,25
Meropenem	32	16	32	16	0,015
Amicacina	8	4	16	4	2
Gentamicina	2	0,5	0,5	0,25	0,5
Kanamicina	32	4	32	32	2
Tobramicina	16	0,5	16	8	0,25
Ciprofloxacino	1	0,004	0,5	0,016	0,004
Levofloxacino	0,5	≤0,008	0,25	≤0,008	0,015
Cloranfenicol	4	2	4	2	2
Fosfomicina	0,75	0,38	0,5	0,38	0,38
Tigeciclina	0,25	0,03	0,25	0,125	0,5
Polimixina B	1	0,5	1	0,25	0,5
Rifampicina	512	8	512	512	8

*TF1A - Transformante derivado de *E. hormaechei* E0083033-1; **TF2A - Transformante derivado de *E. coli* E0083033-2.

5.5 Análise da sequência do plasmídeo pEh1A

A sequência de DNA completa do plasmídeo pEh1A, originalmente isolado de *E. hormaechei* E0083033-1, foi obtido com uma profundidade média de 470 vezes utilizando-se a plataforma MiSeq (Illumina). É um plasmídeo circular de 96.124 pb com um conteúdo G+C de 53,1% e 100 quadros de leitura aberta (Figura 11). Quando o plasmídeo pEh1A completo foi comparado com sequência depositadas no GenBank, observou-se um índice de similaridade de 99% com sequências pertencentes a dois plasmídeos IncF, um de Porto Alegre, Brasil (GenBank NG_041719.1) isolado de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” e outro do plasmídeo pKPX-1 de *Klebsiella pneumoniae*, descrito em Taiwan sobre um paciente

O plasmídeo pKPX-1 (250.444 pb) contém todos os genes e operons encontrados no plasmídeo pEh1A. Esses dois plasmídeos diferem na ordem dos

operon, como o operon de resistência a arsênico, na qual o quadro aberto de leitura está invertido se considerarmos o quadro de leitura do gene *bla*_{NDM-1} no plasmídeo pEh1A. Eles também diferem pela presença de um gene codificando uma proteína hipotética e um gene *tnpA* truncado, ambos estão depois do operon de resistência ao arsênico no plasmídeo pEh1A. Eles também diferem pela presença do gene *tnpR* truncando a IS3000 depois do gene *groES*. A sequência completa de nucleotídeos dos dois plasmídeos mostrou 93,8% de similaridade (90.184/96.124).

Nós comparamos os genes *oriV* e *repA* (posições dos nucleotídeos 1 a 1.276) do plasmídeo pEh1A com aqueles previamente estudados por Villa et al. (Villa, Garcia-Fernandez et al. 2010). Um alto índice de similaridade (99% - 1.273/1.276) foi observado com o plasmídeo pKF3-94 (GenBank FJ876826.1) na qual pertence ao grupo IncFII_K. A região *oriV* de pEh1A tem dois DnaA boxes antes do gene *repA*, uma região rica em AT com 63,3% de conteúdo AT (posições do nucleotídeo 146 a 224) e cinco íterons caracterizados pela sequência de nucleotídeos GGTG^T/_G^G/_T distantes cada um por 15 ou 16 bases (posições do nucleotídeo 245 a 335).

Referente à transferência plasmidial e estabilidade, ele possui operons *tra* e *trb* descritos como capazes de transferência conjugativa. Há um operon *ccdAB* codificando uma antitoxina e uma toxina, envolvido em morte de células livres de plasmídeos após segregação. Um operon completo de resistência ao arsênico está localizado nas posições nucleotídicas de 21.296 a 25.604.

O plasmídeo tem uma cópia única do gene *bla*_{NDM-1} flanqueado à montante por uma IS*Aba125* truncada e à jusante pelo gene *ble*_{MBL}. Está localizado dentro da estrutura designada neste trabalho por Tn3000.

plasmídeos IncX albergando genes codificando proteínas envolvidas em replicação do plasmídeo: *pir*, *bis*, *parA*, *hns* e *topB*. Ele tem um operon completo contendo genes *pilX* codificando o aparato de conjugação e, também, genes *taxA*, *taxB* e *taxC* que implicam na transferência plasmidial. A sequência do gene *taxC* foi comparada com depósitos do GenBank de plasmídeos IncX publicados recentemente (Chen, Chavda et al. 2013). Uma alta similaridade foi observada com os depósitos JN935899 – plasmídeo pEC14_35 (95.4%) e JN247852 – plasmídeo pIncX-SHV (95.3%) os quais pertencem ao grupo de incompatibilidade IncX3.

O plasmídeo pEc2A tem uma única cópia do gene *bla*_{NDM-1} flanqueado à montante por uma IS*Aba125* truncada e à jusante pelo gene *ble*_{MBL}. Da mesma forma que no plasmídeo pEh1A IncFII_K, o gene *bla*_{NDM-1} está localizado no transpóson Tn3000.

O pEc2A tem um integron de classe 1 com 99% de similaridade ao integron In37 (GenBank AY259086). Sua região variável possui quatro cassetes gênicos, *aac(6')-Ib-cr*, *bla*_{OXA-30}, *catB3* e *arr3*. Visando avaliar o fenótipo determinado por esses genes, CIMs para tobramicina, amicacina, kanamicina, ciprofloxacino e rifampicina foram determinadas para o transformante albergando o plasmídeo pEc2A, onde foram observados aumentos de 2 a 64 vezes se comparados com *E. coli* TOP10 sem o plasmídeo. Não houve elevação nas CIMs para cloranfenicol ou gentamicina.

Comparado ao integron In37, o plasmídeo pEc2A possui uma deleção de 217 pb entre o primeiro gene cassete (*aac(6')-Ib-cr*) e o promotor do cassete, que removeu os primeiros 83 pb do gene *intl1*, o promotor do *intl1*, e o sítio *attI1*. O promotor PcWTGN-10 permanece íntegro, com os sinais -35 nas posições de nucleotídeos 10.382 a 10.387 e -10 nas posições 10.405 a 10.410.

5.7 Atividade de *bla*_{OXA-30}

Não foram observadas zonas de inibição quando comparados discos de ampicilina contendo ou não EDTA 0,1 M, quando testamos o TF2A. Porém, uma zona de inibição de 19 mm foi observada nos discos contendo EDTA 0,1 M, quando testamos o TF1A. Isto indica que, no transformante TF2A o EDTA conseguiu inibir a enzima NDM, porém *bla*_{OXA-30} está ativa, causando resistência à ampicilina (Figura 13).

Figura 13. Teste fenotípico para avaliar a atividade de *bla*_{OXA-30}. Discos laranjas possuem adição da solução de EDTA 0,1 M. (A) *Escherichia coli* TOP10; (B) TF2A; (C) TF1A.

5.8 O transpóson Tn3000

O transpóson Tn3000 tem 11.823 pb e está flanqueado por duas cópias da IS3000. A primeira cópia truncou a porção 5' da IS_{Aba125} antes do gene *bla*_{NDM-1}. À jusante do gene *bla*_{NDM-1}, observamos um gene de resistência a bleomicina (*ble*_{MBL}), um gene codificando a isomerase fosforibosiolantranilato (*trpF*), um gene de sinalização da via de translocação de dupla arginina (*tat*) e um gene *cutA1* codificando uma proteína tolerante a íons divalente. Os genes *groEL* e *groES* estão

presentes no mesmo transpóson, porém o gene *groEL* está truncado na porção 3' pela inserção da segunda cópia da IS3000. Todas as regiões do Tn3000 foram confirmadas por PCR e Sequenciamento de Sanger, conforme demonstrado na figura 14.

Figura 14. Primers utilizados para confirmação do Tn3000 e seus respectivos alvos.

A sequência completa do transpóson, dos plasmídeos pEh1A e pEc2A, são 100% idênticas. Quando comparamos com sequências depositadas no GenBank, utilizando BLAST, cinco sequências plasmidiais tiveram uma similaridade significativa com o Tn3000 (Figura 15). O Tn3000 possui 99,9% de similaridade com os plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncF e IncH, originalmente de *Klebsiella pneumoniae*, da cidade de Kathmandu - Nepal (GenBank CP008933.1) e Rabat - Marrocos (GenBank JN420336.1), países da Ásia e África, respectivamente. Quando reanotados, essas duas sequências plasmidiais possuem a mesma estrutura do transpóson Tn3000 (Figura 15).

Figura 15. Comparação linear de diferentes plasmídeos albergando o transpósão *Tn3000* no mundo. *Uma deleção de um pb no gene *bla_{NDM-1}* na posição 25.509 criou um stop códon nas posições 25.532-34. #Uma deleção de um pb no gene *orf2* da *ISKpn19* na posição 32.162 alterou a fase de leitura originalmente descrita. Observação: os genes em negrito são as modificações na anotação original.

Outros dois plasmídeos, de Porto Alegre, Brasil (GenBank NG_041719.1) e New Delhi, Índia (plasmídeo pKPX-1, GenBank AP012055.1) também possuem o transpósão *Tn3000*, mas a *IS3000* localizada após o gene *groEL* está truncada em

ambos os depósitos. Para o depósito NG_041719.1 apenas a sequência parcial está disponível no GenBank. As duas repetições invertidas (IRs) da segunda cópia da IS3000 estão presentes, porém o gene *tnpA*, não anotado no depósito original, perdeu 1.370 pb.

No plasmídeo pNDM-BTR da China, a porção 5' do Tn3000 está conservada, porém, a segunda cópia da IS3000 foi truncada pela inserção da IS*Kpn19*.

O alinhamento das sequências do Tn3000 mostrou que cada cópia da IS3000 difere da descrição original realizada na Espanha (GenBank AF174129.1) por três pares de base (posições do nucleotídeo 232, 1.586, 2.849, 8.820, 10.174, 11.437 – numerados a partir do Tn3000).

O Tn3000 de plasmídeos do Brasil, isolados em 2013, aproximam-se mais do plasmídeos isolado no Nepal em 2011, pois difere por três pares de base enquanto que o plasmídeo isolado no Marrocos (2011) difere por cinco pares de base (Figura 16).

Figura 16. Polimorfismos no transpósom Tn3000 em diferentes plasmídeos no mundo (marcados em vermelho). *Depósito original da sequência de inserção IS3000 no GenBank. **Depósito original da sequência de inserção ISAbA125 no GenBank. ***Depósito original do gene *bla*_{NDM-1} no GenBank.

A sequência nucleotídica do Tn3000 do plasmídeo isolado em 2012 em Porto Alegre, Brasil (NG_041719.1) é 100% idêntica às descritas neste projeto, apesar de estar incompleta na porção referente a um dos genes de transposase (Figura 15). Plasmídeos da Índia (AP012055.1) e China (KF534788.1) diferem de nossos plasmídeos por três e duas bases, respectivamente.

Os polimorfismos C232G, T591A, C1586G, G2849C, T9179A, C10174G, T10202A e G11437C (numerados baseando-se no Tn3000) resultaram em substituições de aminoácidos. Os polimorfismos T1614A e T3510C não resultaram em substituições de aminoácidos. No que se refere ao polimorfismo na posição 3.510, os três Tn3000 do Brasil possuem uma tirosina enquanto plasmídeos de outros países possuem uma citosina. Não foram observadas repetições diretas flanqueando o transpósom Tn3000 nas sequências analisadas.

5.9 Ensaio de transposição

Após metodologias de digestão dos plasmídeos pEc2A e pUC19 com enzima de restrição HindIII e clonagem dos fragmentos com enzima T4 ligase, o vetor foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10 e selecionado em ágar LB contendo 4 µg/mL de ceftazidima + 0,5 mM IPTG + 80 µg/mL X-gal. Dez colônias brancas foram reisoladas para confirmação da presença do gene *bla*_{NDM-1}. Foram extraídos plasmídeos dos transformantes TOP pUC19::Tn3000 e verificou-se a presença de um plasmídeo de aproximadamente 21 Kb.

Foram preparadas células eletrocompetentes da cepa *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pB10. Em seguida, o plasmídeo da cepa TOP pUC19::Tn3000 foi extraído e transformado em *E. coli* DH5α pB10. Seleção dos transformantes em ágar

LB + 4 µg/mL de ceftazidima + 30 µg/mL de tetraciclina foi realizada. Dez colônias foram reisoladas para confirmação da presença do gene *bla*_{NDM-1}. Foram extraídos plasmídeos dos transformantes DH5α pB10 + pUC19::Tn3000 e verificou-se a presença de dois plasmídeos de aproximadamente 64 Kb e 21 Kb, respectivamente.

A transposição do Tn3000 do plasmídeo pUC19 para pB10 ocorreu quando elevamos a temperatura de crescimento bacteriano em caldo LB + 4 µg/mL de ceftazidima + 30 µg/mL de tetraciclina para 42°C. Este experimento foi realizado em triplicata (A, B e C) e a transposição foi observada no primeiro repique do isolado C, sendo a cepa denominada DH5α pB10::Tn3000C.

A cepa *E. coli* J53 foi utilizada para conjugação com a cepa DH5α pB10::Tn3000C, sendo que os transconjugantes foram selecionados em ágar LB + 4 µg/mL de ceftazidima + 125 µg/mL azida sódica. Cinco colônias da cepa J53 pB10::Tn3000C foram reisoladas para confirmação da presença do gene *bla*_{NDM-1}.

Foi realizada extração de plasmídeo da cepa J53 pB10::Tn3000C e o transconjugante apresenta um único plasmídeo de aproximadamente 80 Kb.

Após análise do sequenciamento, verificou-se que o Tn3000 está completamente transposto no plasmídeo pB10. À esquerda do Tn3000 encontra-se gene do plasmídeo pB10, porém, à direita do transpóson, há uma região inserida entre o Tn e o pB10, podendo ser parte de cromossomo ou plasmídeo de amostras utilizadas neste ensaio (cromossomos de *E. coli* TOP10, DH5α ou J53 ou plasmídeo pUC19).

5.10 Presença do Tn3000 em outros plasmídeos de isolados deste estudo

Três diferentes tamanhos plasmidiais foram observados (Figura 17), sendo

aproximadamente 100 Kb, 140 Kb e 200 Kb. Em todos os plasmídeos analisados, nenhum conflito foi observado quando foi realizado a montagem dos contigs utilizando a sequência nucleotídica do Tn3000 como referência.

A cobertura foi de 100% para todos os isolados. Em oito amostras, o gene *bla*_{NDM-1} foi localizado em plasmídeos, dentro do novo transpóson Tn3000. Esta estrutura foi observada em diferentes gêneros bacterianos: cinco *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*”, um *Citrobacter freundii*, uma *Escherichia coli*, todos do Rio de Janeiro e uma *Klebsiella pneumoniae* de Salvador (Figura 18).

Figura 17. Perfil plasmidial dos transformantes. No gel de eletroforese: (1) Cepa de referência *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (plasmídeos de 154 Kb; 66,2 Kb; 37,6 Kb; 7,4 Kb – não demonstrado); (2) TF3A; (3) TF4A; (4) TF6A; (5) TF7A; (6) TF15A; (7) TF18A; (8) TF19A; (9) TF21A.

Figura 18. Comparação linear de plasmídeos de diferentes tamanhos e gêneros bacterianos albergando o transpôson Tn3000. De cima para baixo: (1) Plasmídeo pEh1A; (2) Plasmídeo do TF3A; (3) Plasmídeo do TF4A; (4) Plasmídeo do TF6A; (5) Plasmídeo do TF7A; (6) Plasmídeo do TF15A; (7) Plasmídeo do TF18A; (8) Plasmídeo do TF19A; (9) Plasmídeo do TF21A.

5.11 Análise da sequência dos plasmídeos pEh18A e pEc19A

Após análise dos sequenciamentos dos transformantes TF18A e TF19A, verificou que a amostra E8162888 possui dois isolados, de gêneros bacterianos distintos, *Enterobacter hormaechei* "subsp. oharae" e *Escherichia coli*, contendo os mesmos plasmídeos albergando o gene *bla*_{NDM-1}, denominados pEh18A e pEc19A, respectivamente. Os plasmídeos possuem 96.164 pb e pertencem ao grupo IncFII_K

(Figura 19).

Figura 19. Perfil plasmidial dos transformantes. No gel de eletroforese: (1) e (4) Cepa de referência *E. coli* 39R861 NCTC 50192 (plasmídeos de 154 Kb; 66,2 Kb; 37,6 Kb; 7,4 Kb); (2) TF18A; (3) TF19A.

5.12 Comparação plasmidial dos transformantes TF1A e TF18A

Quando comparamos o plasmídeo pEh18A (extraído do transformante TF18A) com o pEh1A, verificamos apenas a inserção de 40 pb (Figura 20) em uma região entre uma proteína hipotética e um gene *resD* (Figura 21). Este gene atua como um repressor da transcrição e como uma resolvase sítio-específica que cliva o sítio RfsF.

Figura 20. Comparação linear dos nucleotídeos dos plasmídeos pEh1A e pEh18A.

Figura 21. Imagem do pEh1A demonstrando a região de inserção de 40 pb no plasmídeo pEh18A. As marcações em amarelo e rosa são para delimitar a região de inserção.

A amostra E0083033-1, de onde foi isolado o plasmídeo pEh1A de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, foi coletada em Agosto/2013 em um hospital no Rio de Janeiro. Já a amostra E8162888-1, contendo o plasmídeo pEh18A de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*”, foi coletada em Abril/2014 em outro hospital no Rio de Janeiro. Isto demonstra a capacidade de um mesmo plasmídeo se disseminar após oito meses, para diferentes hospitais, em subespécies bacterianas distintas.

5.13 Análise das sequências dos plasmídeos detectados em *Acinetobacter*

Nos isolados *Acinetobacter radioresistens* E3263934, *Acinetobacter ursingii* E5131942 e *Acinetobacter guillouiae* F020263 foi detectado o mesmo plasmídeo designado pE3263934.

A sequência completa do plasmídeo circular possui 41.087 pb, um conteúdo G+C de 38,3% e 47 quadros de leitura aberta. Quando a sequência nucleotídica foi comparada com sequências depositadas no GenBank, observou-se um índice de

similaridade de 99% com dois plasmídeos, ambos da China, sendo o pNDM-JN01 isolado de *Acinetobacter lwoffii* (GenBank KM210086.1) e o pNDM-JN02 isolado de *Acinetobacter* spp. (GenBank KM210088.1).

Quanto à transferência plasmidial e estabilidade, o plasmídeo possui três quadros abertos de leitura do operon *tra*, denominados *traA*, *traC* e *traD*, e oito quadros abertos de leitura do operon *virB*: *virB1*, *virB4*, *virB5*, *virB6*, *virB8*, *virB9*, *virB10* e *virB11*.

O plasmídeo tem uma cópia única do gene *bla*_{NDM-1}, flanqueado à montante por uma *ISAb_a125* truncada e à jusante pelo gene *ble*_{MBL}. Quanto ao grupo de incompatibilidade, o plasmídeo é não tipável.

6 DISCUSSÃO

Até a finalização deste estudo observamos na cidade do Rio de Janeiro a presença de enterobactérias albergando o gene *bla*_{NDM-1} em plasmídeos, ao contrário do que ocorre no estado de São Paulo, onde foram isolados bacilos não fermentadores – *Acinetobacter* spp.

Este trabalho descreve a presença de um novo elemento genético contendo o gene *bla*_{NDM-1} – Tn3000 – em plasmídeos de distintos grupos de incompatibilidade detectados em diferentes continentes. Quando foram detectadas *E. coli* e *E. hormaechei* produzindo NDM-1 em uma mesma amostra de swab retal, nossa primeira hipótese foi que ocorreu transferência plasmidial entre os isolados, mas quando realizamos a extração de plasmídeos e eletroforese em gel de agarose, observamos plasmídeos de tamanhos bastante diferentes.

Subsequentemente, nós introduzimos ambos os plasmídeos em *E. coli* TOP10 e observamos que eram estáveis após replicação na mesma célula, sugerindo que pertenciam a grupos de incompatibilidade distintos. Quando as sequências completas de DNA de ambos os plasmídeos foram determinadas, fomos capazes de confirmar que pertenciam a grupos de incompatibilidade diferentes: IncFII_K e IncX3.

Neste trabalho foram caracterizadas as duas primeiras sequências completas de plasmídeos contendo *bla*_{NDM-1} no Brasil.

O gene *bla*_{NDM-1} tem sido encontrado em plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade IncF, IncH, IncL, IncM, IncX (Poirel, Dortet et al. 2011; Hu, Hu et al. 2012) e, às vezes, alguns não tipáveis. O plasmídeo pEh1A pertencente ao grupo IncFII_K foi encontrado em *Enterobacter hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” em

2013 é altamente similar ao plasmídeo isolado de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” em 2014 em Porto Alegre, uma cidade localizada 1.571 km distante da cidade do Rio de Janeiro (Carvalho-Assef, Pereira et al. 2014). Porém, o plasmídeo de Porto Alegre foi reportado possuindo 250 kb, sendo que o plasmídeo descrito neste projeto possui 96.124 pb.

Para confirmar que a disseminação de plasmídeos no Brasil é um fator importante, a sequência completa do DNA do plasmídeo de Porto Alegre necessita ser determinada. Este é um achado importante, pois uma publicação propôs que a disseminação de genes *bla*_{NDM-1} não estão relacionados com plasmídeos específicos ou uma única estrutura genética (Poirel, Dortet et al. 2011).

No plasmídeo IncFII_K pEh1A foram observados genes comumente encontrados em plasmídeos do grupo IncF, como *repA*, *parA*, *resD* e *ccdAB*, porém ele possui um operon de resistência ao arsênico (*arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* e *arsC*) ao invés do operon de resistência ao mercúrio, encontrado em cinco plasmídeos IncF (Szczepanowski, Braun et al. 2005). A estrutura genética observada no plasmídeo extraído de *Escherichia coli* (pEc2A) é similar a descrita por Nordman e colaboradores (Norman, Hansen et al. 2008), na qual foram observados os genes *pir-bis-par-hns-topB-pilX-actX-taxCA*.

A genética da resistência a antimicrobianos do plasmídeo inclui o In37 e o Tn3000. No que diz respeito ao integron In37, a elevação de CIMs para tobramicina, amicacina, kanamicina e ciprofloxacina, a resistência à ampicilina na presença de EDTA e à rifampicina no transformante contendo o plasmídeo pEc2A são consistentes com a expressão de cassetes de genes conduzidos pelo promotor Pc. A ausência de expressão do terceiro gene do cassete em In37 (*catB3*) é indicada pelos baixos valores de CIMs observados para cloranfenicol, tanto para a cepa

selvagem como para o transformante. Se considerarmos que os genes à montante (*bla_{OXA-30}*) e à jusante (*arr3*) do gene *catB3* são expressos, a ausência de elevação da CIM para cloranfenicol é mais provavelmente devida a uma atenuação pós-transcricional, como previamente relatado por Stokes et al (Stokes and Hall 1991).

O plasmídeo pEc2A isolado a partir de *E. coli* pertence ao grupo de incompatibilidade IncX3. Isso indica um grande potencial de disseminação de *bla_{NDM-1}* no Brasil, como relatado recentemente na China (Ho, Li et al. 2012) e nos Emirados Árabes Unidos (Sonnevend, Al Baloushi et al. 2013).

Descobrimos que a mesma estrutura genética Tn3000 está presente em plasmídeos de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade detectados durante o período de 2010 a 2017, em diferentes países e continentes (Campos, da Silva et al. 2015; Mataseje, Peirano et al. 2016; Aires, Pereira et al. 2017). A IS3000 foi originalmente descrita por Sabate et al. (Sabate, Navarro et al. 2002). Foi encontrado no integron In60 mas orientado no sentido oposto dos cassetes gênicos. Estes autores detectaram a presença do In60 contendo a IS3000 em um total de 30 cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de fontes independentes, mas eles não foram capazes de demonstrar a ocorrência de eventos de transposição usando uma estratégia vector-seleção positiva (Simon, Hotte et al. 1991). Uma possibilidade para explicar a presença deste elemento em diferentes plasmídeos seria a ocorrência de recombinação homóloga, mas, neste caso, as regiões que flanqueiam a IS3000 seriam idênticas em plasmídeos diferentes. Este não é o caso nos plasmídeos que descrevemos ou citamos. Se IS3000 e Tn3000 não fossem elementos móveis, seria difícil explicar como eles poderiam ser encontrados flanqueados por diferentes estruturas gênicas.

A presença de uma IS3000 truncada na porção 3' no Tn3000 no plasmídeo

pKPX-1 da China indica que Tn3000 é uma estrutura ancestral. Sua inserção neste plasmídeo precedeu o segundo evento de transposição que resultou no truncamento da IS3000.

A sequência completa do transpóson Tn3000 foi encontrada em dois outros plasmídeos, pPMK1-NDM (GenBank CP008933.1) e DMNP-MAR (GenBank JN420336.1) do Nepal e Marrocos, respectivamente. Se considerarmos que a sequência Tn3000 dos plasmídeos que descrevemos neste projeto, na qual foram isoladas no Rio de Janeiro, Brasil, em agosto de 2013, é idêntica a do plasmídeo isolado em Porto Alegre, Brasil, em setembro de 2012, a frequência de mutações em Tn3000 é menor do que uma a cada 11 meses. Zhao et al. analisou 110 amostras abrigando três plasmídeos com tamanhos de 70.057 a 147.416 pb, por NGS com a plataforma Illumina. Quando compararam as sequências de plasmídeos completos obtidos em diferentes anos a partir de diferentes amostras eles encontraram de 331 a 1.256 polimorfismos, dependendo do plasmídeo estudado (Zhao, Bai et al. 2010). Se extrapolarmos este número para um par de amostras e uma estrutura de 11,8 kb, como é o caso de Tn3000, esta faixa seria de 1 a 2,8 polimorfismos em quatro anos. Consequentemente, nossos resultados de ausência de polimorfismos comparando as sequências de DNA do Tn3000 dos plasmídeos isolados no Brasil, num intervalo de 11 meses, é consistente com os achados de Zhao et al. Se usarmos estas taxas de mutação para calcular a distância evolutiva nos anos que separam o Tn3000 detectado no Brasil daqueles detectados em diferentes continentes, a menor distância evolutiva seria quando comparamos com a sequência do Nepal. Comparando o Tn3000 do Brasil e Nepal, o tempo necessário para ter os três polimorfismos seria de 4,3 a 12 anos. O plasmídeo isolado no Nepal, foi detectado em agosto de 2011. Se compararmos a sequência de DNA do Tn3000 do Brasil com

o do Marrocos, também detectada em 2011, há cinco polimorfismos e sua distância evolutiva seria 7,1 a 20 anos.

Com resultados dos experimentos de transposição e sequenciamento da cepa contendo o Tn3000 transposto, observamos que o transpóson descrito neste estudo medeia a disseminação do gene *bla*_{NDM-1} entre diferentes continentes do mundo, conforme confirmado em outras duas publicações (Mataseje, Peirano et al. 2016; Aires, Pereira et al. 2017).

Os plasmídeos de três espécies diferentes de *Acinetobacter* spp. possuem o mesmo tamanho (41.087 pb) e estrutura genética, principalmente pelos genes *tra* e *virB*, responsáveis pela transferência plasmidial. O plasmídeo tem uma cópia única do gene *bla*_{NDM-1}, flanqueado à montante por uma *IS**Aba125* truncada e à jusante pelo gene *ble*_{MBL}. Este contexto difere, portanto, daquele descrito por nosso grupo em *Enterobacteriaceae*, mediado pelo Tn3000 (Campos, da Silva et al. 2015).

O primeiro relato de *Acinetobacter baumannii* albergando *bla*_{NDM} em plasmídeo no Brasil ocorreu em 2014. Este isolado pertence ao ST25 e possui um plasmídeo de aproximadamente 100 Kb (Pillonetto, Arend et al. 2014). Porém, o gene *bla*_{NDM-1} já foi reportado em diferentes plasmídeos pelo mundo, em diferentes espécies de *Acinetobacter*. A detecção de um mesmo plasmídeo em diferentes espécies de *Acinetobacter* evidencia que neste gênero bacteriano, no Brasil, a disseminação do gene *bla*_{NDM-1} ocorre por conjugação.

7 CONCLUSÕES

Em todos os isolados analisados neste estudo o gene *bla*_{NDM-1} foi detectado em plasmídeos.

Na maioria dos isolados da família *Enterobacteriaceae*, o gene *bla*_{NDM-1} foi detectado em uma nova estrutura, designada Tn3000.

O mesmo transpóson Tn3000 albergando o gene *bla*_{NDM-1} foi detectado em plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade no Brasil, Nepal, Marrocos e Índia.

Em três espécies distintas de *Acinetobacter* foi detectado o mesmo plasmídeo não tipável de 41 Kb, albergando o gene *bla*_{NDM-1}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, C. A., P. S. Pereira, et al. (2017). "Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil." Antimicrob Agents Chemother **61**(4).
- Amato Neto, V., A. C. Nicodemo, et al. (2007). Antibióticos na Prática Médica, Sarvier.
- Babic, M., A. M. Hujer, et al. (2006). "What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases." Drug Resist Updat **9**(3): 142-156.
- Barantsevich, E. P., I. V. Churkina, et al. (2013). "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia." J Antimicrob Chemother **68**(5): 1204-1206.
- Barlow, M. (2009). "What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer?" Methods Mol Biol **532**: 397-411.
- Barrios, H., U. Garza-Ramos, et al. (2013). "Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico." J Antimicrob Chemother **68**(8): 1934-1936.
- Bartolleti, F., B. M. Seco, et al. (2016). "Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil." Emerg Infect Dis **22**(10): 1849-1851.
- Ben Nasr, A., D. Decre, et al. (2013). "Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia." Antimicrob Agents Chemother **57**(8): 4089-4090.
- Birgy, A., C. Doit, et al. (2011). "Early detection of colonization by VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and NDM-1-producing *Escherichia coli* in two children returning to France." J Clin Microbiol **49**(8): 3085-3087.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Bogaerts, P., W. Bouchahrouf, et al. (2011). "Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 3036-3038.
- Bogaerts, P., R. Rezende de Castro, et al. (2012). "Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium." J Antimicrob Chemother **67**(6): 1552-1553.
- Bonnin, R. A., L. Poirel, et al. (2012). "Dissemination of New Delhi metallo- β -

- lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe." Clin Microbiol Infect **18**(9): E362-365.
- Boulanger, A., T. Naas, et al. (2012). "NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 2214-2215.
- Brady, C., I. Cleenwerck, et al. (2013). "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*." Syst Appl Microbiol **36**(5): 309-319.
- Bush, K. (2001). "New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy." Clin Infect Dis **32**(7): 1085-1089.
- Bush, K. (2013). "Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases." Ann N Y Acad Sci **1277**: 84-90.
- Bush, K. and J. F. Fisher (2011). "Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria." Annu Rev Microbiol **65**: 455-478.
- Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of β -lactamases." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 969-976.
- Bush, K., T. Palzkill, et al. (2015). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Lahey Clinic.
- Campana, E. H., L. F. Montezzi, et al. (2017). "NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach." Int J Antimicrob Agents **49**(1): 119-121.
- Campos, J. C., M. J. da Silva, et al. (2015). "Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India." Antimicrob Agents Chemother **59**(12): 7387-7395.
- Carattoli, A. (2013). "Plasmids and the spread of resistance." Int J Med Microbiol **303**(6-7): 298-304.
- Carmo Junior, N. V., H. F. Filho, et al. (2015). "First report of a NDM-producing

- Providencia rettgeri strain in the state of Sao Paulo." Braz J Infect Dis **19**(6): 675-676.
- Carvalho-Assef, A. P., P. S. Pereira, et al. (2013). "Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil." J Antimicrob Chemother **68**(12): 2956-2957.
- Carvalho-Assef, A. P., P. S. Pereira, et al. (2014). "Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil." Antimicrob Agents Chemother **58**(4): 2475-2476.
- Casali, N. and A. Preston (2003). Methods in Molecular Biology. E. coli plasmid vectors: methods and applications. H. Press: 235.
- CDC (2010). "Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo- β -lactamase - United States, 2010." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **59**(24): 750.
- Chagas, T. P., A. P. Carvalho-Assef, et al. (2015). "Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil." J Glob Antimicrob Resist **3**(2): 147-148.
- Chan, H. L., L. M. Poon, et al. (2011). "The perils of medical tourism: NDM-1-positive *Escherichia coli* causing febrile neutropenia in a medical tourist." Singapore Med J **52**(4): 299-302.
- Chen, L., K. D. Chavda, et al. (2013). "Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4} and *bla*_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey." Antimicrob Agents Chemother **57**(1): 269-276.
- Chen, Y., Z. Zhou, et al. (2011). "Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China." J Antimicrob Chemother **66**(6): 1255-1259.
- Cho, S. Y., H. J. Huh, et al. (2015). "*Klebsiella pneumoniae* Co-Producing NDM-5 and OXA-181 Carbapenemases, South Korea." Emerg Infect Dis **21**(6): 1088-1089.
- Chou, A., M. Roa, et al. (2016). "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST273 Carrying *bla*_{NDM-7} and ST656 Carrying *bla*_{NDM-1} in Manila, Philippines." Microb Drug Resist **22**(7): 585-588.
- CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition - CLSI Document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement - CLSI Document M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- D'Andrea, M. M., C. Venturelli, et al. (2011). "Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases." J Clin Microbiol **49**(7): 2755-2758.

- de Araujo, C. F., D. M. Silva, et al. (2016). "Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil." Antimicrob Agents Chemother **60**(7): 4380-4383.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, et al. (2010). "Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria." FEMS Microbiol Rev **34**(1): 18-40.
- Delgado-Blas, J. F., C. M. Ovejero, et al. (2016). "Coexistence of *mcr-1* and *bla*_{NDM-1} in *Escherichia coli* from Venezuela." Antimicrob Agents Chemother **60**(10): 6356-6358.
- Dionisio, F., I. Matic, et al. (2002). "Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities." Genetics **162**(4): 1525-1532.
- Donowitz, G. R. and G. L. Mandell (1988). "Drug therapy. β -lactam antibiotics." N Engl J Med **318**(8): 490-500.
- Donowitz, G. R. and G. L. Mandell (1988). " β -Lactam antibiotics." N Engl J Med **318**(7): 419-426.
- Dortet, L., P. Nordmann, et al. (2012). "Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 1693-1697.
- Dortet, L., L. Poirel, et al. (2012). "New Delhi metallo- β -lactamase 4-producing *Escherichia coli* in Cameroon." Emerg Infect Dis **18**(9): 1540-1542.
- Eggleston, K., R. Zhang, et al. (2010). "The global challenge of antimicrobial resistance: insights from economic analysis." Int J Environ Res Public Health **7**(8): 3141-3149.
- Escobar Perez, J. A., N. M. Olarte Escobar, et al. (2013). "Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1957-1960.
- Espinal, P., G. Fugazza, et al. (2011). "Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center." Antimicrob Agents Chemother **55**(11): 5396-5398.
- Ferreira, A. M., A. L. Mondelli, et al. (2016). "First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil." J Hosp Infect **94**(1): 73-74.
- Fiett, J., A. Baraniak, et al. (2014). "The first NDM metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolate in Poland: evolution of IncFII-type plasmids carrying the *bla*_{NDM-1} gene." Antimicrob Agents Chemother **58**(2): 1203-1207.
- Fu, Y., X. Du, et al. (2012). "Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*_{NDM-1} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China." J Antimicrob Chemother **67**(9): 2114-2122.

- Fukushima, M., K. Kakinuma, et al. (2002). "Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence." J Clin Microbiol **40**(8): 2779-2785.
- Gefen-Halevi, S., M. Y. Hindiyeh, et al. (2013). "Isolation of genetically unrelated *bla*_{NDM-1}-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel." J Clin Microbiol **51**(5): 1642-1643.
- Gharout-Sait, A., S. A. Alsharapy, et al. (2014). "Enterobacteriaceae isolates carrying the New Delhi metallo- β -lactamase gene in Yemen." J Med Microbiol **63**(Pt 10): 1316-1323.
- Ghazawi, A., A. Sonnevend, et al. (2012). "NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates." Clin Microbiol Infect **18**(2): E34-36.
- Giakkoupi, P., K. Tryfinopoulou, et al. (2013). "Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece." Diagn Microbiol Infect Dis **77**(4): 382-384.
- Gillings, M. R. (2013). "Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome." Front Microbiol **4**: 4.
- Gootz, T. D. (2004). "Global dissemination of β -lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems." Expert Rev Anti Infect Ther **2**(2): 317-327.
- Gottig, S., A. G. Hamprecht, et al. (2013). "Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity." J Antimicrob Chemother **68**(8): 1737-1740.
- Gottig, S., Y. Pfeifer, et al. (2010). "Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase." Lancet Infect Dis **10**(12): 828-829.
- Grohmann, E., G. Muth, et al. (2003). "Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 277-301, table of contents.
- Hall, J. M., E. Corea, et al. (2014). "Molecular mechanisms of β -lactam resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Sri Lanka." J Med Microbiol **63**(Pt 8): 1087-1092.
- Hammerum, A. M., M. A. Toleman, et al. (2010). "Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase." Lancet Infect Dis **10**(12): 829-830.
- Hamzan, N. I., C. Y. Yean, et al. (2015). "Detection of *bla*_{IMP4} and *bla*_{NDM1} harboring *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital in Malaysia." Emerg Health Threats J **8**: 26011.
- Hanson, N. D. and C. C. Sanders (1999). "Regulation of inducible AmpC β -lactamase expression among *Enterobacteriaceae*." Curr Pharm Des **5**(11): 881-894.
- Hartstein, A. I., V. H. Morthland, et al. (1989). "Restriction enzyme analysis of

- plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *Staphylococcus aureus* blood culture isolates." J Clin Microbiol **27**(8): 1874-1879.
- Hartstein, A. I., V. H. Morthland, et al. (1990). "Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies anitratus from intubated and mechanically ventilated patients." Infect Control Hosp Epidemiol **11**(10): 531-538.
- Ho, P.-L., Z. Li, et al. (2012). "Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying *bla*_{NDM-1} in *Enterobacteriaceae* isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China." Emerging Microbes and Infections **1**: 1-6.
- Ho, P. L., W. U. Lo, et al. (2011). "Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong." PLoS One **6**(3): e17989.
- Hoffmann, H. and A. Roggenkamp (2003). "Population genetics of the nomencluspecies *Enterobacter cloacae*." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5306-5318.
- Hoffmann, H., S. Stindl, et al. (2005). "*Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance." J Clin Microbiol **43**(7): 3297-3303.
- Hopkins, K. L., D. Meunier, et al. (2016). "SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK." J Med Microbiol **65**(7): 696-697.
- Hornsey, M., L. Phee, et al. (2011). "A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom." Antimicrob Agents Chemother **55**(12): 5952-5954.
- Hrabak, J., M. Stolbova, et al. (2012). "NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011." Euro Surveill **17**(7).
- Hu, H., Y. Hu, et al. (2012). "Novel plasmid and its variant harboring both a *bla*_{NDM-1} gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 1698-1702.
- Isozumi, R., K. Yoshimatsu, et al. (2012). "*bla*_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam." Emerg Infect Dis **18**(8): 1383-1385.
- Jacobs, C., B. Joris, et al. (1995). "AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase." Mol Microbiol **15**(3): 553-559.
- Jacoby, G. A., D. M. Mills, et al. (2004). "Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*."

Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 3203-3206.

Jamal, W., V. O. Rotimi, et al. (2012). "Emergence of nosocomial New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait." Int J Antimicrob Agents **39**(2): 183-184.

Johnson, A. P. and N. Woodford (2013). "Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance." J Med Microbiol **62**(Pt 4): 499-513.

Jovcic, B., Z. Lepsanovic, et al. (2014). "Two copies of *bla*_{NDM-1} gene are present in NDM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Serbia." Antonie Van Leeuwenhoek **105**(3): 613-618.

Jovcic, B., Z. Lepsanovic, et al. (2013). "The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the *bla*_{NDM-1} gene in a novel genetic context." Antimicrob Agents Chemother **57**(7): 3405-3407.

Kaase, M., P. Nordmann, et al. (2011). "NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt." J Antimicrob Chemother **66**(6): 1260-1262.

Karthikeyan, K., M. A. Thirunarayan, et al. (2010). "Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India." J Antimicrob Chemother **65**(10): 2253-2254.

Karuniawati, A., Y. R. Saharman, et al. (2013). "Detection of carbapenemase encoding genes in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* isolated from patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011." Acta Med Indones **45**(2): 101-106.

Kazmierczak, K. M., S. Rabine, et al. (2016). "Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **60**(2): 1067-1078.

Khajuria, A., A. K. Praharaj, et al. (2016). "Presence of a novel variant NDM-10, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* isolate." Indian J Med Microbiol **34**(1): 121-123.

Koh, T. H., C. T. Khoo, et al. (2010). "Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase." Lancet Infect Dis **10**(12): 828.

Kumarasamy, K. K., M. A. Toleman, et al. (2010). "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study." Lancet Infect Dis **10**(9): 597-602.

Liu, Z., Y. Wang, et al. (2017). "Plasmid-Mediated Novel *bla*_{NDM-17} Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain." Antimicrob Agents Chemother **61**(5).

- Lowman, W., C. Sriruttan, et al. (2011). "NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa." S Afr Med J **101**(12): 873-875.
- Macrina, F. L., D. J. Kopecko, et al. (1978). "A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules." Plasmid **1**(3): 417-420.
- Maiwald, M. (2004). Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice, American Society for Microbiology.
- Manageiro, V., D. A. Sampaio, et al. (2015). "Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal." Genome Announc **3**(5).
- Martins, W. M., J. R. Cordeiro-Moura, et al. (2016). "Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1-producing *Enterobacteriaceae* isolates." Diagn Microbiol Infect Dis **84**(3): 246-248.
- Massova, I. and S. Mobashery (1998). "Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(1): 1-17.
- Mataseje, L. F., G. Peirano, et al. (2016). "Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 654 with *bla*_{NDM-1} Arrives in North America." Antimicrob Agents Chemother **60**(3): 1794-1800.
- Mathers, A. J., H. L. Cox, et al. (2011). "Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid." MBio **2**(6): e00204-00211.
- Mazzariol, A., Z. Bosnjak, et al. (2012). "NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia." Emerg Infect Dis **18**(3): 532-534.
- McDermott, H., D. Morris, et al. (2012). "Isolation of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland, July 2011." Euro Surveill **17**(7).
- McGann, P., J. Hang, et al. (2012). "Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying *bla*_{NDM-1} in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 1673-1679.
- Montana, S., R. Cittadini, et al. (2016). "Presence of New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1) in a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in Argentina." New Microbes New Infect **11**: 43-44.
- Nakazawa, Y., R. Ii, et al. (2013). "A case of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* transferred from India to Japan." J Infect Chemother **19**(2): 330-332.

- Nemec, A. and L. Krizova (2012). "Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the NDM-1 gene, Czech Republic, 2011." Euro Surveill **17**(11).
- Nicoletti, A. G., M. F. Marcondes, et al. (2015). "Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil." Antimicrob Agents Chemother **59**(9): 5159-5164.
- Nikaido, H. (2009). "Multidrug resistance in bacteria." Annu Rev Biochem **78**: 119-146.
- Nordmann, P., A. E. Boulanger, et al. (2012). "NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 2184-2186.
- Nordmann, P., L. Dortet, et al. (2012). "Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!" Trends Mol Med **18**(5): 263-272.
- Norman, A., L. H. Hansen, et al. (2008). "Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux." Plasmid **60**(1): 59-74.
- Normark, B. H. and S. Normark (2002). "Evolution and spread of antibiotic resistance." J Intern Med **252**(2): 91-106.
- Ogbolu, D. O. and M. A. Webber (2014). "High-level and novel mechanisms of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria from tertiary hospitals in Nigeria." Int J Antimicrob Agents **43**(5): 412-417.
- Osterblad, M., J. Kirveskari, et al. (2012). "Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008-11)." J Antimicrob Chemother **67**(12): 2860-2864.
- Pagano, M., L. Poirel, et al. (2015). "Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil." Int J Antimicrob Agents **45**(4): 444-445.
- Pasteran, F., E. Albornoz, et al. (2012). "Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala." J Antimicrob Chemother **67**(7): 1795-1797.
- Pasteran, F., M. M. Mora, et al. (2014). "Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay." J Antimicrob Chemother **69**(9): 2575-2578.
- Patel, G. and R. A. Bonomo (2013). "'Stormy waters ahead': global emergence of carbapenemases." Front Microbiol **4**: 48.
- Peirano, G., D. R. Pillai, et al. (2011). "The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada." Diagn Microbiol Infect Dis **71**(2): 106-109.
- Pereira, C. A., A. R. Marra, et al. (2013). "Nosocomial bloodstream infections in

- Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features." PLoS One **8**(7): e68144.
- Pereira, P. S., R. M. Albano, et al. (2015). "Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(4): 580-582.
- Pereira, P. S., M. Borghi, et al. (2015). "Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil." Microb Drug Resist **21**(2): 234-236.
- Perry, J. A. and G. D. Wright (2013). "The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic." Front Microbiol **4**: 138.
- Pfaller, M. A. and R. N. Jones (1997). "A review of the *in vitro* activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30,254 aerobic and anaerobic pathogens isolated world wide." Diagn Microbiol Infect Dis **28**(4): 157-163.
- Pfeifer, Y., G. Wilharm, et al. (2011). "Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007." J Antimicrob Chemother **66**(9): 1998-2001.
- Pillonetto, M., L. Arend, et al. (2014). "First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil." Antimicrob Agents Chemother **58**(12): 7592-7594.
- Poirel, L., A. Benouda, et al. (2011). "Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco." J Antimicrob Chemother **66**(12): 2781-2783.
- Poirel, L., R. A. Bonnin, et al. (2012). "Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM}-like genes in *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1087-1089.
- Poirel, L., L. Dortet, et al. (2011). "Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*." Antimicrob Agents Chemother **55**(11): 5403-5407.
- Poirel, L., E. Lagrutta, et al. (2010). "Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4914-4916.
- Poirel, L., M. Ozdamar, et al. (2012). "NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey." Antimicrob Agents Chemother **56**(5): 2784-2785.
- Poirel, L., G. Revathi, et al. (2011). "Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 934-936.
- Poirel, L., E. Savov, et al. (2014). "Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria." Antimicrob Agents Chemother **58**(4): 2472-2474.
- Poirel, L., J. Schrenzel, et al. (2011). "Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland." J Antimicrob Chemother

66(8): 1730-1733.

- Poirel, L., T. R. Walsh, et al. (2011). "Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes." Diagn Microbiol Infect Dis **70**(1): 119-123.
- Pritsch, M., A. Zeynudin, et al. (2017). "First report on *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* in three clinical isolates from Ethiopia." BMC Infect Dis **17**(1): 180.
- Procop, G., D. Church, et al. (2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Wolters Kluwer.
- Quiles, M. G., T. T. Rocchetti, et al. (2015). "Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates." Braz J Med Biol Res **48**(2): 174-177.
- Quinones, D., I. Carvajal, et al. (2015). "High prevalence of *bla* OXA-23 in *Acinetobacter* spp. and detection of *bla*_{NDM-1} in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010-2012)." New Microbes New Infect **7**: 52-56.
- Rafei, R., F. Dabboussi, et al. (2014). "First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war." Int J Infect Dis **21**: 21-23.
- Rasheed, J. K., B. Kitchel, et al. (2013). "New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States." Emerg Infect Dis **19**(6): 870-878.
- Ribot, E. M., M. A. Fair, et al. (2006). "Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet." Foodborne Pathog Dis **3**(1): 59-67.
- Rimrang, B., A. Chanawong, et al. (2012). "Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing *Enterobacteriaceae* in Thailand." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2626-2630.
- Rogers, B. A., H. E. Sidjabat, et al. (2013). "Treatment options for New Delhi metallo- β -lactamase-harboring *Enterobacteriaceae*." Microb Drug Resist **19**(2): 100-103.
- Rozales, F. P., C. M. Magagnin, et al. (2017). "Characterization of Transformants Obtained From NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil." Infect Control Hosp Epidemiol **38**(5): 634-636.
- Rozales, F. P., V. B. Ribeiro, et al. (2014). "Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil." Int J Infect Dis **25**: 79-81.
- Saavedra, S. Y., R. Cayo, et al. (2014). "Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report." Braz J Infect Dis **18**(6): 678-680.

- Sabate, M., F. Navarro, et al. (2002). "Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying blaCTX-M-9." Antimicrob Agents Chemother **46**(8): 2656-2661.
- Salabi, A. E., M. A. Toleman, et al. (2010). "First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 582.
- Sambrook, J. J. and D. D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- Sampaio, J. L. and A. C. Gales (2016). "Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins." Braz J Microbiol **47** Suppl 1: 31-37.
- Samuelsen, O., C. M. Thiesen, et al. (2011). "Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway." J Antimicrob Chemother **66**(3): 670-672.
- Schreterova, E., V. Takacova, et al. (2014). "Methods of phenotypic determination of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Slovakia." Klin Mikrobiol Infekc Lek **20**(3): 79-84.
- Schuelter-Trevisol, F., G. J. Schmitt, et al. (2016). "New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter* spp. infection: report of a survivor." Rev Soc Bras Med Trop **49**(1): 130-134.
- Schultsz, C. and S. Geerlings (2012). "Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy." Drugs **72**(1): 1-16.
- Seija, V., J. C. Medina Presentado, et al. (2015). "Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomycin and meropenem: case report and literature review." Int J Infect Dis **30**: 20-26.
- Shrestha, B., T. Tada, et al. (2015). "Identification of a novel NDM variant, NDM-13, from a multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal." Antimicrob Agents Chemother **59**(9): 5847-5850.
- Simon, R., B. Hotte, et al. (1991). "Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors." J Bacteriol **173**(4): 1502-1508.
- Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, et al. (2010). "Mobility of plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **74**(3): 434-452.
- Sole, M., C. Pitart, et al. (2011). "First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain." Antimicrob Agents Chemother **55**(9): 4402-4404.
- Sonnevend, A., A. Al Baloushi, et al. (2013). "Emergence and spread of NDM-1

- producer *Enterobacteriaceae* with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates." J Med Microbiol **62**(Pt 7): 1044-1050.
- Stokes, H. W. and R. M. Hall (1991). "Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation." Plasmid **26**(1): 10-19.
- Sung, J. Y., S. H. Koo, et al. (2015). "Emergence of *Acinetobacter pittii* harboring New Delhi metallo- β -lactamase genes in Daejeon, Korea." Ann Lab Med **35**(5): 531-534.
- Sykes, R. (2010). "The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective." J Antimicrob Chemother **65**(9): 1842-1852.
- Szczepanowski, R., S. Braun, et al. (2005). "The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions." Microbiology **151**(Pt 4): 1095-1111.
- Szekely, E., I. Damjanova, et al. (2013). "First description of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-181} producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania." Int J Med Microbiol **303**(8): 697-700.
- Tada, T., T. Miyoshi-Akiyama, et al. (2013). "NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2394-2396.
- Tada, T., B. Shrestha, et al. (2014). "NDM-12, a novel New Delhi metallo- β -lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal." Antimicrob Agents Chemother **58**(10): 6302-6305.
- Tavares, W. (1996). Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. São Paulo, Atheneu.
- Team, R. C. (2012). R: A language and environment for statistical computing. R. F. f. S. Computing. Vienna, Austria.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-2239.
- Thoms-Rodriguez, C. A., T. Mazzulli, et al. (2016). "New Delhi metallo- β -lactamase in Jamaica." J Infect Dev Ctries **10**(2): 183-187.
- Tognim, M. C. B., L. C. J. Gaziri, et al. (1998). "Association of Plasmid Typing to Biotyping and Antibiotyping in the Characterization of Outbreaks by *Acinetobacter baumannii*."
- Toleman, M. A., J. Spencer, et al. (2012). "*bla*_{NDM-1} is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **56**(5): 2773-2776.

- Villa, L., A. Garcia-Fernandez, et al. (2010). "Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants." J Antimicrob Chemother **65**(12): 2518-2529.
- Walsh, T. R. (2010). "Emerging carbapenemases: a global perspective." Int J Antimicrob Agents **36 Suppl 3**: S8-14.
- Wang, X., H. Li, et al. (2014). "Novel NDM-9 metallo- β -lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China." Int J Antimicrob Agents **44**(1): 90-91.
- Waterman, P. E., P. McGann, et al. (2013). "Bacterial peritonitis due to *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 with plasmid-borne new delhi metallo- β -lactamase in Honduras." Antimicrob Agents Chemother **57**(9): 4584-4586.
- Weldhagen, G. F. (2004). "Integrans and b-lactamases-a novel perspective on resistance." Int J Antimicrob Agents **23**(6): 556-562.
- Williamson, D. A., J. T. Freeman, et al. (2013). "Rectal colonization with New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Escherichia coli* prior to transrectal ultrasound (TRUS)-guided prostate biopsy." J Antimicrob Chemother **68**(12): 2957-2959.
- Wu, H. S., T. L. Chen, et al. (2010). "First identification of a patient colonized with *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{NDM-1} in Taiwan." J Chin Med Assoc **73**(11): 596-598.
- Yang, J., Y. Chen, et al. (2012). "Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China." Clin Microbiol Infect **18**(12): E506-513.
- Yong, D., M. A. Toleman, et al. (2009). "Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India." Antimicrob Agents Chemother **53**(12): 5046-5054.
- Zarfel, G., M. Hoenigl, et al. (2011). "Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase, Austria." Emerg Infect Dis **17**(1): 129-130.
- Zavascki, A. P., D. R. Falci, et al. (2014). "Heteroresistance to carbapenems in New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing isolates: a challenge for detection?" Infect Control Hosp Epidemiol **35**(6): 751-752.
- Zhao, F., J. Bai, et al. (2010). "Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*." PLoS One **5**(4): e10141.
- Zou, D., Y. Huang, et al. (2015). "A novel New Delhi metallo- β -lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese Hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems." Antimicrob Agents Chemother **59**(4): 2450-2453.

- Zowawi, H. M., A. L. Sartor, et al. (2014). "Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: dominance of OXA-48 and NDM producers." Antimicrob Agents Chemother **58**(6): 3085-3090.
- Zurita, J., H. Parra, et al. (2015). "First case of NDM-1-producing *Providencia rettgeri* in Ecuador." J Glob Antimicrob Resist **3**(4): 302-303.

Apêndice A – Artigo Científico

Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India

Juliana Coutinho Campos,^a Maria José Félix da Silva,^b Paulo Roberto Nascimento dos Santos,^c Elaine Menezes Barros,^a Mayne de Oliveira Pereira,^a Bruna Mara Silva Seco,^a Cibele Massotti Magagnin,^d Leonardo Kalab Leiroz,^b Théo Gremen Mimary de Oliveira,^e Célio de Faria-Júnior,^f Louise Teixeira Cerdeira,^g Afonso Luís Barth,^d Suely Carlos Ferreira Sampaio,^h Alexandre Prehn Zavascki,^{d,i} Laurent Poirel,^j Jorge Luiz Mello Sampaio^{a,k}

School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^a; Fleury Group, Microbiology Section, Rio de Janeiro, Brazil^b; Children's Hospital, Rio de Janeiro, Brazil^c; Research Laboratory of Bacterial Resistance, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil^d; Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^e; Núcleo de Bacteriologia, GBM/Laboratório Central de Saúde Pública, Lacen-Brasília, Brasília, Brazil^f; Core Facility for Scientific Research, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^g; Microbiology Department, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil^h; Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazilⁱ; Medical and Molecular Microbiology Unit, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland^j; Fleury Diagnostic Medicine, Microbiology Section, São Paulo, Brazil^k

In *Enterobacteriaceae*, the *bla*_{NDM} genes have been found in many different genetic contexts, and a wide diversity of plasmid scaffolds bearing those genes has been found. In August 2013, we identified NDM-1-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter hormaechei* strains from a single rectal swab sample from a patient hospitalized in Rio de Janeiro, Brazil, who had no history of travel abroad. Complete DNA sequencing using the Illumina platform and annotation of the two plasmids harboring the *bla*_{NDM-1} gene, one from each strain, showed that they belonged to incompatibility groups IncFII_K and IncX3 and harbored a novel transposon named Tn3000. Similar genetic structures have been identified among other isolates in Brazil but also on plasmids from other continents. Our findings suggest that the *bla*_{NDM-1} gene may be transmitted by Tn3000 in different parts of the world.

Since the original description of NDM-1 carbapenemase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (1), 11 variants of this enzyme have been reported, with NDM-1 being the most prevalent (2). These enzymes have now been detected worldwide in *Enterobacteriaceae* (3), in *Pseudomonas aeruginosa* (4), and in many different *Acinetobacter* species (5). It has been proposed that the dissemination of the *bla*_{NDM-1} gene among *Acinetobacter* strains is mediated by a composite transposon designated Tn125, with two IS_{Aba125} copies bracketing the resistance gene module (6). Although in *Acinetobacter* the *bla*_{NDM-1} has most frequently been found chromosomally located, some reports have described this gene located on plasmids (7, 8).

In *Enterobacteriaceae*, the *bla*_{NDM} genes have been found mainly on plasmids (9). In contrast to the more conserved genetic environment observed in *Acinetobacter* spp., many different genetic contexts have been described in *Enterobacteriaceae*, with a wide diversity of plasmids harboring *bla*_{NDM} genes (10–13). Among NDM variants described to date, all but NDM-2 and NDM-14 were detected in *Enterobacteriaceae* (14). Most of the sequences available in GenBank have a complete or truncated IS_{Aba125} upstream and the *ble*_{MBL} gene downstream from the *bla*_{NDM} gene. Many different mobile elements have been found bracketing these genes and can potentially mobilize them (15). Three examples of genetic elements bearing the *bla*_{NDM-1} gene are (i) the Tn125 transposon (6), originally described in *Acinetobacter* but now detected in *Enterobacteriaceae* (16), (ii) the one detailed under GenBank accession no. KP900016 (17), in which an IS5 family transposase is located upstream from a truncated IS_{Aba125} and the *bla*_{NDM-1} gene and is also found 6.064 kb downstream from the *bla*_{NDM-1} gene, bracketing a 9.476 kb genetic element, and (iii) the one detailed under GenBank accession no. KR059865

(18), in which IS3000 (IS3 family) is found 2.479 kb upstream from the *bla*_{NDM-1} gene and a Tn_{Asn3}-like *tnpA*, also from IS3 family, is found 4.757 kb downstream from the *bla*_{NDM-1} gene, bracketing a 12.802-kb genetic element.

There are few reports on genes other than *bla*_{NDM-1} which include complete mobile elements both upstream and downstream from the *bla*_{NDM} gene. In GenBank deposit AB898038 (19), an IS6 family transposase truncates the IS_{Aba125} and an unknown transposase is present 2.367 kb downstream from the *bla*_{NDM-3} gene. In *K. pneumoniae* plasmid pJEG027 (20), an IS5 family transposase truncates the IS_{Aba125} and IS26 is found 2.189 kb downstream from the *bla*_{NDM-4} gene. A similar genetic structure is present in GenBank deposits KP826705 (unpublished) and KP178355 (21), containing, respectively, the *bla*_{NDM-7} and *bla*_{NDM-5} genes.

In Brazil, the first NDM-positive strain was reported in 2013, bearing a chromosomally located *bla*_{NDM-1} gene in *Providencia rettgeri* (22). Subsequently, plasmid-borne *bla*_{NDM-1} genes were identified in *Enterobacter hormaechei* (23), *Enterobacter cloacae*, P.

Received 29 June 2015 Returned for modification 7 August 2015

Accepted 30 August 2015

Accepted manuscript posted online 21 September 2015

Citation Campos JC, da Silva MJF, dos Santos PRN, Barros EM, Pereira MDO, Seco BMS, Magagnin CM, Leiroz LK, de Oliveira TGM, Faria-Júnior CD, Cerdeira LT, Barth AL, Sampaio SCF, Zavascki AP, Poirel L, Sampaio JLM. 2015. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for *bla*_{NDM-1} dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. Antimicrob Agents Chemother 59:7387–7395. doi:10.1128/AAC.01458-15.

Address correspondence to Jorge Luiz Mello Sampaio, sampaio@usp.br.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

rettgeri, *K. pneumoniae* (24), and *Acinetobacter baumannii* (25), but the sequences of these plasmids remain unknown. In *E. hormaechei*, the plasmid was reported to be ~420 kb (23), while in *E. cloacae*, *P. rettgeri*, and *K. pneumoniae*, the plasmid was reported to be ~230 kb (24) and in *A. baumannii* the estimated plasmid size was 100 kb (25).

In this study, we aimed to characterize the genetic environment surrounding the *bla*_{NDM-1} gene in two *Enterobacteriaceae* species, *E. coli* and *E. hormaechei*, which were simultaneously recovered from a rectal swab from a hospitalized patient who had never traveled outside Brazil. Our investigation revealed that in both isolates, the *bla*_{NDM-1} gene was carried in an original transposon structure.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Two NDM-producing strains, *E. hormaechei* E0083033-1 and *E. coli* E0083033-2, recovered from the same rectal swab sample from a pediatric patient on August 2013 in Rio de Janeiro, Brazil, were used in this study. The patient was under treatment for acute lymphoblastic leukemia and was admitted at Children's Hospital for 2 days for skin-tunneled central venous catheter placement. She had no history of previous infections or colonization by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), but since she had been previously hospitalized in another institution, according to institutional infection control recommendations, a rectal swab sample was collected for CRE surveillance.

Species identification. Identification of species was done by mass spectrometry (MS) using the Vitek MS system (bioMérieux), as recommended by the manufacturer.

Molecular identification was performed by partial sequencing of the *gyrB* gene, as previously described (26). The identification of the *Enterobacter* strains at the species level was confirmed by partial sequencing of the *hsp60* gene, as previously described (27, 28), except that Platinum *Taq* DNA polymerase was used in PCRs and DNA sequences were obtained using BigDye Terminator version 3.1 and a 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Contigs were assembled using DNABaser program version 3.4.5 (Heracle Biosoft) and subsequently compared to the sequences from the type strains available at GenBank, using the BLAST program.

Detection of carbapenemase-encoding genes by PCR and sequencing. Multiplex PCRs for the *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{SPM} genes were performed as previously described (29), except that primers 27F (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) and 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) were included in order to amplify the 16S rRNA gene as an internal control (30). For full-length amplification of the *bla*_{NDM-1} gene, primers NDM-L-bleo-FW (5'-TGGGTCGAGGTCAGGATAGG) and NDM-R-Aba-125-RV (5'-GCTTTTGAAACTGTGCGACCT) were designed using Primer-BLAST. Amplicons were sequenced and assembled as described above.

Plasmid extraction, transformation, and conjugation assays. Plasmid DNA was obtained from the wild-type (WT) strains by alkaline extraction (31) and subsequently used to transform *E. coli* TOP10 (Invitrogen) by electroporation. Transformants were selected on LB agar containing ceftazidime (4 mg/liter). Conjugation experiments were performed using WT strains as donors and *E. coli* J53 as the recipient, as described previously (32). Transconjugants were selected on LB agar containing ceftazidime (4 mg/liter) plus sodium azide (125 mg/liter). The presence of the *bla*_{NDM-1} gene in transformants and transconjugants was confirmed by PCR (29).

Estimation of plasmid size was performed after 0.7% agarose gel electrophoresis, using a curve obtained by plotting the distance (millimeters) from the origin against the decimal logarithm of the plasmid size (154 kb, 66.2 kb, 37.6 kb, and 7.4 kb) from the reference strain *E. coli* 39R861 (33).

Antimicrobial susceptibility profile of WT strains and their transformants. Antimicrobial susceptibility profiles were determined by broth microdilution (34) using cation-adjusted Mueller-Hinton broth (Becton-Dickinson) and Etest strips for fosfomycin and aztreonam. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control. Results were interpreted according to the M100-S25 document from CLSI (35), except for tigecycline and fosfomycin, for which results were interpreted according to the EUCAST breakpoints (36). For polymyxin B, the colistin criteria from EUCAST were applied. The disk diffusion method (35, 37) was used to test for ampicillin susceptibility, with and without the addition of 10 µl of a 0.1 M EDTA solution to the disks in order to inhibit the NDM-1 activity. A blank disk containing only 0.1 M EDTA was also included as control.

Complete plasmid sequencing, assembly, annotation, and analysis. Plasmid DNA was extracted (31) from transformants grown overnight at 37°C in an orbital shaker in LB broth containing imipenem (1 mg/liter). DNA samples were tagged using the Nextera DNA sample preparation kit before fragments of ~2,000 bp were captured, purified, and sequenced using a MiSeq Reagent Nano kit, v2 (500 cycles), in MiSeq equipment from Illumina. Sequences were assembled *de novo* in contigs using the SeqMan NGen program version 4.0 (DNASTar) and subsequently aligned using SeqMan Pro version 10.1.1 (DNASTar). Open reading frames (ORFs) were predicted and annotated using RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) (38). Manual curation and sequence similarity searches directed against the GenBank database were carried out using the ARTEMIS genome browser and annotation tool (39). Insertion sequences were manually reviewed, directing searches against the IS Finder database (<https://www-is.biotoul.fr/>) (40). The full plasmid sequences were compared to those available at GenBank using BLAST.

Nucleotide sequence accession numbers. The complete nucleotide sequences of the pEh1A and pEc2A plasmids were deposited in GenBank under accession numbers KR822246 and KR822247, respectively.

RESULTS

Species identification and screening for carbapenemase-encoding genes. Identification using the Vitek MS system identified the E0083033-1 strain as *E. cloacae* complex with 99% confidence. When the *gyrB* partial sequence (1,138 bp) was compared to those pertaining to the reference strains published by Brady et al. (41), the highest similarity (96%) was obtained with *E. hormaechei* strain CCUG 27126. The partial sequence of the *hsp60* gene (341 bp) was identical to that from the type strain of "*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*" DSMZ16691. The Vitek MS system (bioMérieux) identified strain E0083033-2 as *E. coli* with 99% confidence, which was further confirmed by sequencing of the partial *gyrB* sequence (1,138 bp). When the WT strains were tested by multiplex PCR for detection of carbapenemase-encoding genes, both were positive for *bla*_{NDM} and negative for the other genes evaluated. Full sequencing of amplicons identified the *bla*_{NDM-1} gene in both strains.

Plasmid profile, transformation, and conjugation assays. *E. hormaechei* strain E0083033-1 possessed five plasmid bands (ca. 130 kb, ca. 90 kb, ca. 70 kb, ca. 7 kb, and ca. 6 kb), while the *E. coli* transconjugant and transformant strains showed only a single plasmid band of approximately 90 kb (data not shown). *E. coli* strain E0083033-2 exhibited two plasmid bands (160 kb and ca. 70 kb), while the transformant and the transconjugant possessed a single plasmid band of approximately 70 kb (data not shown). The plasmids carrying the *bla*_{NDM-1} gene were successfully transferred by conjugation, at a frequency of 5.3×10^{-1} with *E. hormaechei* strain E0083033-1 as the donor and at a frequency of 6.0×10^{-1} with *E. coli* strain E0083033-2 as the donor.

Antimicrobial susceptibility profiles. The transformant obtained with plasmid DNA extracted from *E. hormaechei*

TABLE 1 MICs for wild-type strains and their transformants

Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for strain ^a :				
	E0083033-1	TF1A	E0083033-2	TF2A	TOP10
Ampicillin	$\geq 2,056$	$\geq 2,056$	$\geq 2,056$	$\geq 2,056$	8
Aztreonam	64	0.094	0.064	0.125	0.094
Cefepime	≥ 64	32	≥ 64	≥ 64	0.06
Cefoxitin	$\geq 1,024$	512	$\geq 1,024$	$\geq 1,024$	8
Ceftazidime	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	0.25
Ceftriaxone	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	0.06
Ertapenem	64	16	64	16	0.015
Imipenem	64	32	32	32	0.25
Meropenem	32	16	32	16	0.015
Amikacin	8	4	16	4	2
Gentamicin	2	0.5	0.5	0.25	0.5
Kanamycin	32	4	32	32	2
Tobramycin	16	0.5	16	8	0.25
Ciprofloxacin	1	0.004	0.5	0.016	0.004
Levofloxacin	0.5	≤ 0.008	0.25	≤ 0.008	0.015
Chloramphenicol	4	2	4	2	2
Fosfomycin	0.75	0.38	0.5	0.38	0.38
Tigecycline	0.25	0.03	0.25	0.125	0.5
Polymyxin B	1	0.5	1	0.25	0.5
Rifampin	512	8	512	512	8

^a E0083033-1, WT *E. hormaechei* strain; TF1A, transformant derived from *E. hormaechei* E0083033-1; E0083033-2, WT *E. coli* strain; TF2A, transformant derived from *E. coli* E0083033-2.

E0083033-1 as the donor showed resistance to all β -lactams tested except aztreonam. It remained susceptible to aminoglycosides, fluoroquinolones, rifampin, and chloramphenicol (Table 1).

E. coli strain E0083033-2 and its transformant were resistant to all β -lactams tested except aztreonam. MICs of tobramycin, amikacin, kanamycin, ciprofloxacin, and rifampin for the corresponding transformants were 2- to 64-fold increased, while those of chloramphenicol and gentamicin were unchanged (Table 1).

No inhibition zones were observed with blank disks containing 0.1 M EDTA or ampicillin disks when testing the transformant harboring pEc2A. Of note, an inhibition zone of 19 mm in diameter was observed with the ampicillin disk with addition of 0.1 M EDTA when testing the transformant containing pEh1A, in which the only antimicrobial resistance gene is *bla*_{NDM-1}.

Plasmid pEh1A sequence analysis. The complete DNA sequence of plasmid pEh1A from *E. hormaechei* E0083033-1 was obtained, with an average depth of coverage of 470. It is a circular 96,124-bp plasmid with a G+C content of 53.1% and carries a total of 100 open reading frames (Fig. 1). DNA sequence comparison with sequences available in GenBank revealed a similarity index of 99% with two IncF plasmids, one from “*E. hormaechei* subsp. *oharae*” recovered in Brazil (GenBank accession no. NG_041719.1) (23) and plasmid pKPX-1 from *K. pneumoniae* recovered in Taiwan from a patient with a history of hospitalization in India (GenBank accession no. AP012055.1) (42). The pEh1A DNA sequence differed from that of *E. hormaechei* by the presence of a 40-bp repeat region at position 70886 (GenBank accession no. NG_041719.1) (23) downstream of the *parA* gene and the lack of a 1,370-bp fragment (partial sequence of the second copy of IS3000).

Comparison of the 250,444-bp plasmid pKPX-1 (42) showed that it contains all gene clusters and operons found in plasmid pEh1A (96,124 bp). These two plasmids differed in the ordering of operons, as the arsenic resistance operon is inverted with respect

to the *bla*_{NDM-1} gene in pEh1A. They also differed by the presence of a gene coding for a hypothetical protein and a truncated *tnpA* gene, both occurring downstream of the arsenic operon in pEh1A, and by the presence of a *tnpR* gene truncating IS3000 downstream of the *groEL* gene. The nucleotide sequences from the two plasmids share 93.8% similarity (90,184 bp identical over the 96,124 bp of pEh1A).

The sequences of the *oriV* and *repA* genes (nucleotide positions 1 to 1276) from plasmid pEh1A were compared to those previously studied by Villa et al. (43). The highest similarity index (99%; 1,273/1,276) was observed with plasmid pKF3-94 (GenBank accession no. FJ876826.1) (44), belonging to the IncFII_K group. The *oriV* region from pEh1A possessed two DnaA boxes upstream from the *repA* gene, with an AT-rich region of 63.3% (nucleotide positions 146 to 224 bp) and five iterons characterized by GGTG(T/G)(G/T) nucleotide sequences distant from each other by 15 or 16 bases (nucleotide positions 245 to 335).

Looking at the features related to plasmid transfer and stability, plasmid pEh1A carries *tra* and *trb* operons, which enable conjugal transfer. A *ccdAB* operon encoding a toxin/antitoxin system involved in postsegregation killing of plasmid-free cells was also identified. A complete arsenic resistance operon was identified at nucleotide positions 21296 to 25604.

The plasmid has a single copy of the *bla*_{NDM-1} gene flanked upstream by a truncated IS_{Aba125} and downstream by the *ble*_{MBL} gene, encoding resistance to bleomycin. That overall structure containing the *bla*_{NDM-1} gene was designated transposon Tn3000.

The Tn3000 transposon is conserved among plasmids from different continents. Transposon Tn3000 is 11,823 bp long and is bracketed by two copies of IS3000. The first copy truncates the 5' portion of the IS_{Aba125} upstream of the *bla*_{NDM-1} gene. Downstream of the *bla*_{NDM-1} gene, the *ble*_{MBL} gene was present, followed by genes encoding a phosphoribosylanthranilate isomerase (*trpF*), a twin-arginine translocation pathway signal protein (*tat*), and a

Two other plasmids, one from Porto Alegre, Brazil (GenBank accession no. [NG_041719.1](#)) (23), and one from New Delhi, India (pKPX-1; GenBank accession no. [AP012055.1](#)), also harbored transposon Tn3000, but the right-hand copy of IS3000 was truncated in those two cases. In the plasmid from Brazil, two inverted repeats (IRs) from the second copy of IS3000 were identified, but the *tnpA* gene lacked a fragment of 1,370 bp (Fig. 2).

Transposon Tn3000 identified on plasmids from Brazil recovered in 2013 and described in this study was closely related to that identified from isolates from Nepal and Morocco, differing by 3 and 5 bp, respectively (Fig. 3).

Plasmid pEc2A sequence analysis. The complete DNA sequence from pEc2A from *E. coli* E0083033-2 was obtained, with an average depth of coverage of 2,771. It is a circular 74,852-bp plasmid with a 50.2% G+C content and 85 ORFs (Fig. 4).

The 29.5-kb backbone structure of plasmid pEc2A is typical of IncX plasmids, with genes encoding replication-associated proteins (*pir*, *bis*, *parA*, *hns*, and *topB*). It has a complete *pilX* operon,

FIG 2 Comparison of Tn3000 transposons of plasmids detected in different continents. *, a single-base-pair deletion in the *bla*_{NDM-1} gene at position 25509 created a stop codon at positions 25532 to 25534. #, a single-base-pair deletion in the *orf2* gene from *ISKpn19* at position 32162 altered the reading frame originally described. Gene names in bold indicate revision of the original annotation.

encoding a conjugation apparatus, and also *taxA*, *taxB*, and *taxC* genes, implicated in plasmid transfer. The *taxC* gene sequence was compared to IncX plasmids recently reviewed (46), and the highest similarity was observed with IncX3 plasmids pEC14_35 (Gen-

Bank accession no. [JN935899](#)) (95.4%) (47) and pIncX-SHV (GenBank accession no. [JN247852](#)) (95.3%) (48).

Plasmid pEc2A has a single copy of the *bla*_{NDM-1} gene flanked upstream by a truncated *ISAbi125* and downstream by the *ble*_{MBL}

FIG 3 Polymorphisms in the Tn3000 transposon in unique plasmids detected in different continents. A dot indicates a nucleotide identical to that from the Tn3000 of the pEh1A plasmid in a given position. A dash indicates the absence of a nucleotide in a given position compared to Tn3000 of the pEh1A plasmid in a given position. Nucleotide numbering refers to the Tn3000 sequence. *, original IS3000 GenBank deposit; **, original ISAb125 GenBank deposit; ***, original blaNDM-1 gene GenBank deposit.

gene. As observed for the IncF plasmid pEh1A, the blaNDM-1 gene occurred within Tn3000.

Plasmid pEc2A has a class 1 integron that is 99% similar to In37 (GenBank accession no. AY259086) (49). It possesses a variable region encompassing four gene cassettes, namely, aac(6')-Ib-cr, blaOXA-30, catB3, and arr3. MICs of tobramycin, amikacin, kanamycin, ciprofloxacin, and rifampin in the transformants harboring plasmid pEc2A were 2- to 64-fold increased compared to those for E. coli TOP10, while no elevation in chloramphenicol and gentamicin MICs was observed (Table 1).

DISCUSSION

The present study describes a new genetic element harboring blaNDM-1, Tn3000, which was found on plasmids of distinct incompatibility groups detected in different continents. Upon isolation of NDM-1-producing E. coli and E. hormaechei from a single rectal swab, our first hypothesis was that plasmid transfer occurred between these enterobacterial species, but plasmid analysis showed sizes that were significantly different. We subsequently introduced both plasmids into a single E. coli TOP10 strain and observed that they replicated and coexisted stably, which suggested different incompatibility groups. DNA sequence analysis confirmed that they belonged to different incompatibility groups: IncFIIK and IncX3. These are the first complete sequences of blaNDM-1-carrying plasmids from Brazil. blaNDM-1 has so far been found on plasmids of incompatibility groups IncF, IncH, IncL, IncM, and IncX (7, 50), as well as untypeable ones. Plasmid pEh1A, belongs to the IncFIIK incompatibility group and was found from “E. hormaechei subsp. steigerwaltii” in 2013; it is highly similar to the partial sequence of a plasmid isolated from “E. hormaechei subsp. oharae” in 2012 (23) in Porto Alegre, 1,571 km away from Rio de Janeiro.

The pEh1A IncFIIK plasmid has genes commonly found in IncF plasmid backbones, such as repA, parA, resD, and ccdAB, but is unusual in having an arsenic resistance operon (arsR, arsD, arsA, arsB, and arsC) instead of a mercury resistance operon (51).

The genetic structure observed in the plasmid extracted from E. coli (pEc2A) is as described by Norman and colleagues (52): pir-bis-par-hns-topB-pilX-actX-taxCA. The antimicrobial resistance genetic determinants located on the plasmid were embedded into two distinct genetic structures, namely, In37 and Tn3000. Concerning the In37 integron, the increased MICs of tobramycin, amikacin, kanamycin, ciprofloxacin, ampicillin, and rifampin observed for the transformant harboring plasmid pEc2A were consistent with the expression of gene cassettes driven by the Pc promoter. Of note, there was likely a lack of expression of the third gene cassette in In37 (catB3), as indicated by the low MICs observed for chloramphenicol in both the wild type and the transformant. If we consider that the genes upstream (blaOXA-30) and downstream (arr3) of the catB3 gene are expressed, the lack of chloramphenicol MIC elevation is most probably due to a post-transcriptional attenuation, as previously reported by Stokes and Hall (53).

The pEc2A plasmid isolated from E. coli belongs to the IncX3 incompatibility group. This suggests considerable potential for dissemination of blaNDM-1 in Brazil, as recently reported from China (54) and the United Arab Emirates (55).

We have found that the same genetic structure Tn3000 is present in plasmids of different sizes and incompatibility groups detected during the period from 2010 to 2013 in different countries and continents. IS3000 was originally described by Sabaté et al. (56). It was found in the In60 integron but oriented in the opposite direction of gene cassettes. These authors detected the presence of In60 containing IS3000 in a total of 30 E. coli and Salmonella species strains isolated from unrelated sources, but they were not able to demonstrate the occurrence of transposition events using a positive-selection vector strategy (57). One possibility to explain the presence of this element in different plasmids would be homologous recombination, but in this case the regions flanking IS3000 would be identical in different plasmids. This is not the case in the plasmids we have described or cited. If IS3000 and Tn3000 are not mobile elements, it would be hard to explain how they could be found flanked by different structures.

2.8 SNPs in 4 years in a 11.8-kb fragment. Consequently our finding of no SNPs when comparing the DNA sequences from Tn3000 in the plasmids isolated in Brazil 11 months apart is consistent with the findings of Zhao et al. (44). If we use these mutation rates to calculate the evolutionary distance in years between Tn3000 detected in Brazil and those detected in different continents, the smallest distance would be with the element from Nepal, with the time required to accumulate the three observed SNPs being 4.3 to 12 years. The plasmid isolated in Nepal was detected in August 2011. If we compare the Tn3000 DNA sequence from Brazil to that from Morocco, also detected in 2011, there are five SNPs, and their evolutive distance would be 7.1 to 20 years.

Conclusions. In summary, we have described the first two complete plasmid sequences harboring *bla*_{NDM-1} from Brazil and have described a new transposon, designated Tn3000, which appears to mediate the transfer of *bla*_{NDM-1} among plasmids from different incompatibility groups in Brazil, Nepal, Morocco, and India.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CAPES and the Fleury Institute.

We thank Michael S. Gilmore, Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, for reviewing the manuscript.

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.
- Zou D, Huang Y, Zhao X, Liu W, Dong D, Li H, Wang X, Huang S, Wei X, Yan X, Yang Z, Tong Y, Huang L, Yuan J. 2015. A novel New Delhi metallo-beta-lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2450–2453. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05168-14>.
- Nordmann P. 2014. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 44:51–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>.
- Zafer MM, Amin M, El Mahallawy H, Ashour MS, Al Agamy M. 2014. First report of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. *Int J Infect Dis* 29:80–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.008>.
- Zhang R, Hu YY, Yang XF, Gu DX, Zhou HW, Hu QF, Zhao K, Yu SF, Chen GX. 2014. Emergence of NDM-producing non-baumannii *Acinetobacter* spp. isolated from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:853–860. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-2024-4>.
- Poirer L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. 2012. Tn125-related acquisition of *bla_{NDM}*-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1087–1089. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05620-11>.
- Hu H, Hu Y, Pan Y, Liang H, Wang H, Wang X, Hao Q, Yang X, Xiao X, Luan C, Yang Y, Cui Y, Yang R, Gao GF, Song Y, Zhu B. 2012. Novel plasmid and its variant harboring both a *bla_{NDM-1}* gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1698–1702. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06199-11>.
- Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, Yu S, Chen L, Liu S. 2013. Complete sequence of the *bla_{NDM-1}*-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother* 68:1681–1682. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt066>.
- Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 303:298–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>.
- Carattoli A, Villa L, Poirer L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Evolution of IncA/C *bla_{CMY-(2)}*-carrying plasmids by acquisition of the *bla_{NDM-1}* carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 56:783–786. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05116-11>.
- Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Gottig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. 2011. Molecular characterization of *bla_{NDM-1}* in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 66:1998–2001. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr256>.
- Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. 2011. Complete sequencing of the *bla_{NDM-1}*-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* 6:e25334. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025334>.
- Villa L, Poirer L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. 2012. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}* and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother* 67:1645–1650. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks114>.
- Shrestha B, Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM. 2015. Identification of a novel NDM variant, NDM-13, from a multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5847–5850. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00332-15>.
- Partridge SR, Iredell JR. 2012. Genetic contexts of *bla_{NDM-1}*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6065–6067. (Author reply, 56:6071.) <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00117-12>.
- Chen Z, Li H, Feng J, Li Y, Chen X, Guo X, Chen W, Wang L, Lin L, Yang H, Yang W, Wang J, Zhou D, Liu C, Yin Z. 2015. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. *Front Microbiol* 6:294. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00294>.
- Sun F, Yin Z, Feng J, Qiu Y, Zhang D, Luo W, Yang H, Yang W, Wang J, Chen W, Xia P, Zhou D. 2015. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adacarboxylata* from China. *Front Microbiol* 6:458. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00458>.
- Yang Q, Fang L, Fu Y, Du X, Shen Y, Yu Y. 2015. Dissemination of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* mediated by the IncX3-type plasmid. *PLoS One* 10:e0129454. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129454>.
- Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Kirikae T. 2014. Biochemical analysis of metallo-beta-lactamase NDM-3 from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3538–3540. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02793-13>.
- Espedido BA, Dimitrovski B, van Hal SJ, Jensen SO. 8 June 2015. The use of whole-genome sequencing for molecular epidemiology and antimicrobial surveillance: identifying the role of IncX3 plasmids and the spread of *bla_{NDM-4}*-like genes in the *Enterobacteriaceae*. *J Clin Pathol* <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203044>.
- Wailan AM, Paterson DL, Caffery M, Sowden D, Sidjabat HE. 2015. Draft genome sequence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 648 and genetic context of *bla_{NDM-5}* in Australia. *Genome Announc* 3:00194–15. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00194-15>.
- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 68:2956–2957. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt298>.
- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. 2014. Detection of NDM-1-, CTX-M-15, and *qnrB4*-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2475–2476. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02804-13>.
- Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. 2015. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. *Braz J Med Biol Res* 48:174–177. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>.
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. 2014. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7592–7594. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03444-14>.
- Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol* 40:2779–2785. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002>.
- Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenclature *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69:5306–5318. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>.
- Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Pierard D, Ziesing S, Heesemann J, Roggenkamp A, Schleifer KH. 2005. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. *J Clin Microbiol* 43:3297–3303. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3297-3303.2005>.
- Poirer L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.
- Maiwald M. 2004. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria, p 379–390. In Persing DH, Tenover FC (ed), *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. ASM Press, Washington, DC.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>.
- Casali N, Preston A (ed). 2003. *E. coli* plasmid vectors: methods and applications. Humana Press, Totowa, NJ.
- Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1:417–420. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X\(78\)90056-2](http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X(78)90056-2).
- CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

35. CLSI. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
36. EUCAST. 2015. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 5.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Basel, Switzerland.
37. CLSI. 2015. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 12th ed. CLSI document M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
38. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
39. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16:944–945. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944>.
40. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34:D32–D36. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj014>.
41. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. 2013. 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*. *Syst Appl Microbiol* 36:309–319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>.
42. Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, Chen CP, Liu YM, Lin AC, Chang YH, Wu KM, Kirby R, Lai JF, Tan MC, Siu LK, Chang CM, Fung CP, Tsai SF. 2013. Copy number change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *PLoS One* 8:e62774. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062774>.
43. Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 65:2518–2529. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq347>.
44. Zhao F, Bai J, Wu J, Liu J, Zhou M, Xia S, Wang S, Yao X, Yi H, Lin M, Gao S, Zhou T, Xu Z, Niu Y, Bao Q. 2010. Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 5:e10141. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010141>.
45. Stoesser N, Giess A, Batty EM, Sheppard AE, Walker AS, Wilson DJ, Didelot X, Bashir A, Sebra R, Kasarskis A, Sthapit B, Shakya M, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Crook DW, Donnelly P, Thorson S, Amaty P, Joshi S. 2014. Genome sequencing of an extended series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonatal infections in a Nepali hospital characterizes the extent of community- versus hospital-associated transmission in an endemic setting. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7347–7357. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03900-14>.
46. Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2013. Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4}- and *bla*_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 57:269–276. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01648-12>.
47. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, Nolan LK, Carattoli A. 2012. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* 68:43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.03.001>.
48. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2143–2145. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05308-11>.
49. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2242–2248. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.7.2242-2248.2003>.
50. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. 2011. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5403–5407. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00585-11>.
51. Szczepanowski R, Braun S, Riedel V, Schneiker S, Krahn I, Puhler A, Schluter A. 2005. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology* 151:1095–1111. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27773-0>.
52. Norman A, Hansen LH, She Q, Sorensen SJ. 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 60:59–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.003>.
53. Stokes HW, Hall RM. 1991. Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid* 26:10–19. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X\(91\)90032-R](http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X(91)90032-R).
54. Ho P-L, Li Z, Lo W-U, Cheung Y-Y, Lin C-H, Sham P-C, Cheng VC-C, Ng T-K, Que T-L, Chow K-H. 2012. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying *bla*_{NDM-1} in *Enterobacteriaceae* isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerg Microbes Infect* 1:6. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2012.37>.
55. Sonnevend A, Al Baloushi A, Ghazawi A, Hashmey R, Girgis S, Hama-deh MB, Al Haj M, Pal T. 2013. Emergence and spread of NDM-1 producer *Enterobacteriaceae* with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol* 62:1044–1050. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.059014-0>.
56. Sabate M, Navarro F, Miro E, Campoy S, Mirelis B, Barbe J, Prats G. 2002. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2656–2661. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.8.2656-2661.2002>.
57. Simon R, Hotte B, Klauke B, Kosier B. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. *J Bacteriol* 173:1502–1508.

Anexo A – Currículo Lattes

Juliana Coutinho Campos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0780618801285329>

Última atualização do currículo em 17/04/2017

Possui Graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Fundação Santo André (Licenciatura e Bacharelado) e Mestrado em Microbiologia Clínica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Atualmente é aluna de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, desenvolvendo sua tese na área de Microbiologia Clínica com ênfase em genes de localização plasmidial que caracterizam resistência a antimicrobianos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Juliana Coutinho Campos
Nome em citações bibliográficas	CAMPOS, J. C.; Campos, J. C.; CAMPOS, JULIANA COUTINHO

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 17 - Laboratório de Microbiologia Clínica Butantã - Cidade Universitária 05508000 - São Paulo, SP - Brasil - Caixa-postal: 66083 Telefone: (11) 30913663 URL da Homepage: www.fcf.usp.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2013	Doutorado em andamento em Ciência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil. Título: Estudo genotípico e fenotípico de bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo New Delhi metalo- β -lactamase, Orientador: Jorge Luiz Mello Sampaio. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Plasmídios; Bacilos Gram-negativos; blaNDM. Grande área: Ciências da Saúde Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.
2011 - 2013	Mestrado em Ciência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido, Ano de Obtenção: 2013. Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Micobactérias de crescimento rápido. Grande área: Ciências da Saúde Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.
2009 - 2011	Aperfeiçoamento em Microbiologia Clínica. (Carga Horária: 480h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Programa de Atualização: Treinamento em Técnicas Microbiológicas e Moleculares. Ano de finalização: 2011. Orientador: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka.
2010 - 2010	Aperfeiçoamento em Microbiologia Clínica. (Carga Horária: 320h). Hospital Universitário - USP, HU-USP, Brasil. Título: Aperfeiçoamento Profissional em Análises Clínicas na Área de Microbiologia. Ano de finalização: 2010. Orientador: Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez.
2005 - 2009	Graduação em Ciências Biológicas. Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil. Título: Caracterização molecular de cepas bacterianas pertencentes ao Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i> (ACB) do Hospital Universitário / USP.

Orientador: Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Ensino Médio (2º grau).
Externato Nossa Senhora Menina, ENSM, Brasil.
Ensino Fundamental (1º grau).
Externato Nossa Senhora Menina, ENSM, Brasil.

2002 - 2004

1994 - 2001

Formação Complementar

2016 - 2016	Como implementar BrCAST e EUCAST no seu laboratório?. (Carga horária: 4h). V Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, V SIMC, Brasil.
2016 - 2016	Novas Metodologias e Stewardship em Microbiologia Clínica. (Carga horária: 8h). Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, LEMC, Brasil.
2014 - 2014	Técnicas Computacionais para Montagem de Genomas. (Carga horária: 25h). Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - UNICAMP, LACTAD-UNICAMP, Brasil.
2014 - 2014	Introdution to MiSeq System and Sample Preparation. (Carga horária: 28h). Illumina Incorporation, ILLUMINA, Brasil.
2014 - 2014	Ultrassequenciamento. (Carga horária: 12h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.
2014 - 2014	Agilent 2200 TapeStation System. (Carga horária: 6h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.
2013 - 2013	Automated Functional Annotation and Data Mining. (Carga horária: 20h). Instituto de Ciências Biomédicas - USP, ICB - USP, Brasil.
2012 - 2012	Introdução ao Programa BioNumerics. (Carga horária: 8h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.
2011 - 2011	Bioestatística. (Carga horária: 12h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.
2011 - 2011	Atualização em Micobactérias não-tuberculosas. (Carga horária: 4h). 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, CBM, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Projeto: "Estudo do contexto genético em bacilos Gram-negativos que albergam o gene blaNDM?. Atuando nos seguintes temas: Bacilos Gram-negativos, plasmídios, blaNDM.

Vínculo institucional

2011 - 2013

Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Projeto: "Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido?. Atuando nos seguintes temas: Micobactérias de Crescimento Rápido, tipagem molecular, plasmídeos, infecção hospitalar e mecanismos de resistências aos antimicrobianos.

Vínculo institucional

2009 - 2010

Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 30

Outras informações

Projeto: "Caracterização Molecular de Cepas Bacterianas pertencentes ao Complexo Acinetobacter calcoaceticus - Acinetobacter baumannii (ACB) do Hospital Universitário da USP". Atuou nos seguintes temas: Acinetobacter baumannii, tipagem molecular, infecção hospitalar e mecanismos de resistências aos antimicrobianos.

Atividades

02/2015 - 06/2015

Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Estágio realizado

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBC0517 - Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da FCF-USP..

08/2013 - 12/2013

Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Estágio realizado

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBC0415 - Fisiopatologia I, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da FCF-USP..

02/2012 - 06/2012

Estágios , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Estágio realizado

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBC0517 - Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da FCF-USP..

Sociedade Brasileira de Microbiologia, SBM, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2014

Outras informações

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 12

Monitora na aula "Testes de sensibilidade e detecção de resistência bacteriana em Gram-positivos e Gram-negativos" (26 e 27/09/2014) do curso de Microbiologia Clínica da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Vínculo institucional

2013 - 2013

Outras informações

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 4

Monitora na aula prática "Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos" (14/09/2013) do curso de Especialização em Microbiologia da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Atividades

10/2013 - 10/2013

Ensino, Especialização em Microbiologia, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Monitora na aula prática "Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos" (19/10/2013) do curso de Especialização em Microbiologia da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

09/2013 - 09/2013

Ensino, Especialização em Microbiologia, Nível: Especialização

Disciplinas ministradas

Monitora na aula prática "Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos" (14/09/2013) do curso de Especialização em Microbiologia da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Walle - Centro de Diagnóstico Ltda, WALLE, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Outras informações

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

Estágio nos setores de microbiologia, imunologia, bioquímica, parasitologia, hematologia.

Hospital Heliópolis, HH, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008

Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

Realização das atividades: extração de DNA; reação de PCR; digestão com enzimas de restrição; eletroforese em gel de agarose / poliacrilamida; lavagem e esterilização de material; elaboração de projetos de pesquisa, discussão de artigos, participação em reuniões científicas.

Vínculo institucional

2007 - 2008

Outras informações

Vínculo: Auxiliar técnica, Enquadramento Funcional: Auxiliar técnica, Carga horária: 20

Realização de atividades biomoleculares, seleção e atualização de dados da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (GENCAPO); coleta de material biológico.

Atividades

02/2008 - 12/2008

Treinamentos ministrados , Hospital Heliópolis, .

Treinamentos ministrados

Participação no curso "Biologia Molecular para a Residência Médica em Cirurgia de Cabeça e Pescoço".

09/2008 - 09/2008

Ensino, Seminário do Projeto de Iniciação Científica, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Apresentação do Projeto de Iniciação Científica referente ao gene MICA.

08/2008 - 08/2008

Outras atividades técnico-científicas , Hospital Heliópolis, Hospital Heliópolis.

Atividade realizada

Participação no seminário de discussão do artigo "Review - Alcohol and cancer"..

07/2008 - 07/2008

Outras atividades técnico-científicas , Hospital Heliópolis, Hospital Heliópolis.

Atividade realizada

Participação no seminário de discussão do artigo "Mechanisms of Malignant Progression"..

06/2008 - 06/2008

Ensino, Tópicos em Biologia Molecular e Câncer, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Aula sobre Transcrição.

02/2008 - 02/2008

Ensino, Tópicos em Biologia Molecular e Câncer, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Aula sobre PCR.

bioMérieux Brasil, BMX, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual

Vínculo: Assessoria Científica, Enquadramento Funcional: Assessor Científico, Carga horária: 40

Projetos de pesquisa

2013 - Atual	Estudo do contexto genético em bacilos Gram-negativos que albergam o gene blaNDM Descrição: Projeto de doutorado. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
2011 - 2013	Integrantes: Juliana Coutinho Campos - Integrante / Jorge Sampaio - Coordenador. Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido Descrição: Projeto de Mestrado. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
2009 - 2010	Integrantes: Juliana Coutinho Campos - Integrante / Jorge Sampaio - Coordenador. Caracterização molecular das cepas bacterianas pertencentes ao complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii</i> (ACB) do Hospital Universitário. Descrição: Projeto de pesquisa utilizado como Trabalho de Conclusão de Curso e Iniciação Científica.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Juliana Coutinho Campos - Coordenador / Marina Baquerizo Martinez - Integrante. Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biologia Molecular.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
---------------	--

Prêmios e títulos

2015	Melhor trabalho da área de Microbiologia Clínica e Infecção Hospitalar, 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia.
2014	Menção Honrosa pelo trabalho, 4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica.
2013	Melhor trabalho - Relatos de Casos e Ensaio Pictóricos, 23ª Jornada do Conhecimento - Grupo Fleury.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

- CAMPOS, JULIANA COUTINHO**; DA SILVA, MARIA JOSÉ FÉLIX ; DOS SANTOS, PAULO ROBERTO NASCIMENTO ; BARROS, ELAINE MENEZES ; PEREIRA, MAYNE DE OLIVEIRA ; SECO, BRUNA MARA SILVA ; MAGAGNIN, CIBELE MASSOTTI ; LEIROZ, LEONARDO KALAB ; DE OLIVEIRA, THÉO GREMEN MIMARY ; DE FARIA, CÉLIO ; CERDEIRA, LOUISE TEIXEIRA ; BARTH, AFONSO LUÍS ; SAMPAIO, SUELY CARLOS FERREIRA ; ZAVASCKI, ALEXANDRE PREHN ; POIREL, LAURENT ; SAMPAIO, JORGE LUIZ MELLO . Characterization of Tn *3000*, a transposon responsible for *bla* NDM-1 dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco and India. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Print) **JCR**, v. 1, p. AAC.01458-15, 2015.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 6 | **SCOPUS** 8
- PELEGRINO, K. D. O. ; **CAMPOS, J. C.** ; Sampaio, S. C. F. ; LEZIROVITZ, K. ; SECO, B. M. ; PEREIRA, M. D. O. ; ROCHA, D. A. D. C. ; JOVE, T. ; NICODEMO, A. C. ; SAMPAIO, J . *fosI*: A New Integron-Associated Gene Cassette Encoding Reduced Susceptibility To Fosfomycin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Print) **JCR**, v. 60, p. 686-688, 2015.
- ROCHA, DARLAN AUGUSTO COSTA ; **CAMPOS, JULIANA COUTINHO** ; PASSADORE, LILIAN FERRI ; SAMPAIO, SUELY CARLOS FERREIRA ; NICODEMO, ANTONIO CARLOS ; SAMPAIO, JORGE LUIZ MELLO . Frequency of Plasmid-Mediated

4. SAMPAIO, J. L. M. ; Ribeiro, V. B. ; **Campos, J. C.** ; ROZALES, F. P. ; MAGAGNIN, C. M. ; FALCI, D. R. ; DA SILVA, R. C. F. ; DALAROSA, M. G. ; LUZ, D. I. ; VIEIRA, F. J. ; ANTOCHEVIS, L. C. ; Barth, A. L. ; Zavascki, A. P. . Detection of OXA-370, an OXA-48-Related Class D -Lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Print) **JCR**, v. 58, p. 3566-3567, 2014.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 6 | **SCOPUS** 6

5. Ribeiro, V. B. ; Zavascki, A. P. ; Nodari, C. S. ; Sandri, A. M. ; Silva, M. P. ; **Campos, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. ; Barth, A. L. . Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Print) **JCR**, v. 67, p. 2776-2777, 2012.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 6 | **SCOPUS** 7

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. TAKAGI, E. H. ; **CAMPOS, J. C.** ; TADDEI, C. R. ; MARTINEZ, M. B. . *Acinetobacter baumannii* and other genomic species: characteristics of adhesion and biofilm.. In: 20º European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, Viena. ECCMID 2010, 2010.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **CAMPOS, J. C.** ; Jorge Luiz Mello Sampaio . How to detect the Tn3000 by PCR. In: V Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2016, São Pedro - SP. V SIMC, 2016.
2. MAGAGNIN, C. M. ; **CAMPOS, J. C.** ; ROZALES, F. P. ; BARTH, A. L. ; ZAVASCKI, A. P. ; SAMPAIO, J. L. M. . First description of complete nucleotide sequence of a plasmid harboring blaOXA-370 in the world. In: XV Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2016, Belo Horizonte. XV CBCIEH, 2016.
3. **CAMPOS, J. C.** ; PEREIRA, M. O. ; AYUB, E. ; SAMPAIO, J. L. M. . First report of NDM-1 producing *Acinetobacter* radioresistens and *Acinetobacter ursingii* from Brazil. In: 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2015, Copenhagen. 25th ECCMID, 2015.
4. **CAMPOS, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . Unraveling a genetic platform for blaNDM-1 gene transfer in Enterobacteriaceae: the Tn3000 transposon. In: XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2015, São Paulo. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2015.
5. SECO, B. M. S. ; **CAMPOS, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . The curing effect of maprotiline on plasmids carrying blaNDM-1. In: XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2015, São Paulo. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2015.
6. **CAMPOS, J. C.** ; SECO, B. M. S. ; ROCHA, D. A. C. ; SAMPAIO, J. L. M. . Tn3000: a transposon responsible for blaNDM-1 dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28º CBM, 2015.
7. SECO, B. M. S. ; **CAMPOS, J. C.** ; ROCHA, D. A. C. ; SAMPAIO, J. L. M. . Maprotiline induces loss of plasmids carrying blaNDM-1 in Enterobacteriaceae. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28º CBM, 2015.
8. ROCHA, D. A. C. ; **CAMPOS, J. C.** ; SECO, B. M. S. ; SAMPAIO, J. L. M. . Plasmid mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in São Paulo, Brazil. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28º CBM, 2015.
9. ROZALES, F. P. ; MAGAGNIN, C. M. ; **CAMPOS, J. C.** ; NUNES, L. S. ; PANCOTTO, L. R. ; SAMPAIO, J. L. M. ; ZAVASCKI, A. P. ; BARTH, A. L. . Plasmid characterization of blaNDM-1-producing Enterobacteriaceae in Brazil. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28º CBM, 2015.
10. **Campos, J. C.** ; SILVA, M. J. F. ; BARROS, E. M. ; PEREIRA, M. O. ; Jorge Luiz Mello Sampaio . First descriptions of plasmids-encoded NDM-1 in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* in Brazil. In: 24th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014, Barcelona. 24th ECCMID, 2014.
11. **CAMPOS, J. C.** ; SILVA, M. J. F. ; BARROS, E. M. ; PEREIRA, M. O. ; OLIVEIRA, F. F. ; SANTOS, P. R. N. ; CUNHA, R. G. ; LEITE, D. B. ; BERNARDES, R. ; LEIROZ, L. K. ; Barth, A. L. ; OLIVEIRA, T. G. M. ; CERDEIRA, L. T. ; SAMPAIO, S. C. F. ; Jorge Luiz Mello Sampaio . *Escherichia coli* albergando plasmídeo conjugativo do grupo IncX com gene blaNDM-1: um armamentário completo para disseminação no Brasil. In: IV Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2014, João Pessoa - PB. IV SIMC, 2014.
12. **CAMPOS, J. C.** ; BARROS, E. M. ; PEREIRA, M. O. ; VILARES, D. P. ; Jorge Luiz Mello Sampaio . Primeiro relato de *Acinetobacter radioresistens* albergando o gene blaNDM-1 no mundo. In: IV Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2014, João Pessoa - PB. IV SIMC, 2014.
13. **CAMPOS, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . Frequency of erm genes in *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and the correlation with inducible clarithromycin resistance phenotype in Brazil. In: 23rd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013, Berlin. 23rd ECCMID, 2013.
14. **Campos, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . Presença concomitante de genes qnrB distintos em *Escherichia coli* resistentes à ciprofloxacina. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º SBM, 2013.
15. SILVA, L. P. P. ; **Campos, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . Avaliação da sensibilidade à polimixina B por microdiluição em caldo com ou sem Tween 80. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º SBM, 2013.
16. ROZALES, F. P. ; RIBEIRO, V. B. ; **Campos, J. C.** ; SILVA, L. P. P. ; ZAVASCKI, A. P. ; Barth, A. L. ; SAMPAIO, J. L. M. . Análise plasmidial de isolados de *Enterobacter cloacae* NDM positivos na cidade de Porto Alegre. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º SBM, 2013.
17. ★ **CAMPOS, J. C.** ; TEIXEIRA, F. ; SAMPAIO, J. L. M. . The Aminoacid Substitution Q154M in GyrA May Contribute to Fluorquinolone Resistance in *Mycobacterium abscessus*. In: 112th General Meeting - American Society for Microbiology, 2012, San Francisco - CA. Anais da 112th General Meeting - ASM, 2012.
18. ★ **CAMPOS, J. C.** ; TEIXEIRA, F. ; SAMPAIO, J. L. M. . Substituições nos aminoácidos W10R e I80V codificados por genes de RNA metilase em *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP. Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

19. PAULA, A. I. C. ; **CAMPOS, J. C.** ; SAMPAIO, J. L. M. . Caracterização fenotípica de *Escherichia coli* resistente à ciprofloxacina isoladas de bacteremias pelo Laboratório Fleury. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP. Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.
20. ★ BRITO, A. C. ; **CAMPOS, J. C.** ; ROCHA, D. A. C. ; MAMIZUKA, E. M. ; SAMPAIO, J. L. M. . Perfil de susceptibilidade de *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* e *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* utilizando-se método de microdiluição - Sensititre® RAPMYCO (TREK Diagnostic Systems). In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP. Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.
21. ★ Magda Morais ; **CAMPOS, J. C.** ; Jorge Luiz Mello Sampaio . Detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC na cidade de Vitória. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do 26º CBM - 2011, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. **CAMPOS, J. C.**; SECO, B. M. S. ; ROCHA, D. A. C. ; BARROS, E. M. ; PEREIRA, M. O. ; SAMPAIO, J. L. M. . Characterization of Tn3000, a transposon responsible for blaNDM-1 dissemination among Enterobacteriaceae in different continents. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **CAMPOS, J. C.**; SAMPAIO, J. L. M. . Determinantes Genéticos da Resistência Antimicrobiana em Micobactérias de Crescimento Rápido. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. SILVA, M. J. F. ; **CAMPOS, J. C.** ; ROSA, T. S. ; SANTOS, A. P. ; NUNES, I. M. Q. ; SILVA, R. P. ; CUNHA, R. G. ; LEITE, D. B. ; BERNARDES, R. ; SACRAMENTO, P. R. ; PEREIRA, D. S. ; REYS, C. P. ; LEIROZ, L. K. ; SAMPAIO, J. L. M. . Primeira detecção de NDM codificada por plasmídios no Brasil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. **CAMPOS, J. C.**. Apresentação do Projeto de Iniciação Científica - gene MICA. 2008. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Demais tipos de produção técnica

1. **Campos, J. C.**. Treinamento equipamento FilmArray. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. VIII Encontro de Atualização em Vírus Respiratórios. 2017. (Encontro).
2. XVII Workshop de Resistência Bacteriana. 2017. (Outra).
3. I Encontro Internacional BrCAST e EUCAST. 2016. (Encontro).
4. V Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. 2016. (Simpósio).
5. XVI Workshop de Resistência Bacteriana. 2016. (Outra).
6. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2015. (Congresso).
7. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. 2015. (Outra).
8. IV Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. 2014. (Simpósio).
9. XIII Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos e organismos geneticamente modificados (OGMs) em instituições de ensino e pesquisa. 2014. (Simpósio).
10. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2013. (Congresso).
11. V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas. Determinantes Genéticos da Resistência Antimicrobiana em Micobactérias de Crescimento Rápido. 2013. (Simpósio).
12. XXIII Jornada do Conhecimento do Grupo Fleury. Primeira detecção de NDM codificada por plasmídios no Brasil. 2013. (Encontro).
13. 112th General Meeting - American Society for Microbiology. 2012. (Congresso).
14. III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. 2012. (Simpósio).
15. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012. (Congresso).
16. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2011. (Congresso).
17. III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2011. (Simpósio).
18. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2011. (Outra).
19. X Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa. 2011. (Simpósio).
20. Curso continuado de Treinamento em Anatomia Humana. 2008. (Outra).
21. IV Fórum sobre Temas Atuais em Nutrição. 2008. (Simpósio).
22. XXII Semana de Ciências - Centro Universitário Fundação Santo André. 2008. (Seminário).
23. II Mini Curso de Técnicas Histológicas. 2007. (Oficina).
24. XX Semana de Ciências - Centro Universitário Fundação Santo André. 2006. (Seminário).
25. XIX Semana de Ciências - Centro Universitário Fundação Santo André. 2005. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **CAMPOS, J. C.**. Plataforma BioNumerics para Bioinformática. 2012. (Outro).

Orientações

Monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Adriana Cunha Rios. Primeiro relato de transferência de plasmídeo albergando blaKPC entre *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* no Brasil. 2013. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Microbiologia Clínica) - Sociedade Brasileira de Microbiologia. Orientador: Juliana Coutinho Campos.

Educação e Popularização de C & T

Cursos de curta duração ministrados

1. **Campos, J. C.**. Treinamento equipamento FilmArray. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 14/05/2017 às 22:09:14

[Imprimir currículo](#)

Anexo B – Ficha do aluno USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6945203/2 - Juliana Coutinho Campos

Email: julianacampos@usp.br
Data de Nascimento: 29/11/1987
Cédula de Identidade: RG - 43.625.381-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciada em Ciências Biológicas - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - Centro Universitário Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2009
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - Centro Universitário Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2010
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 17/05/2013
Início da Contagem de Prazo: 17/05/2013
Data Limite para o Depósito: 17/05/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 17/05/2013 até 11/11/2014. Email: isoares@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jorge Luiz Mello Sampaio - 12/11/2014 até o presente. Email: sampaio@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/05/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 09/06/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/05/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 14/05/2017 22:13:27

FICHA DO ALUNO

9136 - 6945203/2 - Juliana Coutinho Campos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5748-4/1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	08/04/2014	19/05/2014	60	4	83	A	N	Concluída
FBC5771-7/2	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	02/06/2014	15/06/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	22/09/2014	27/10/2014	75	5	75	A	N	Concluída
MIP5740-1/2	Genômica e Bioinformática em Doenças Infecciosas (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/11/2014	30/11/2014	60	0	-	-	N	Turma cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0517 Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	23/02/2015	04/07/2015	-	3	100	-	-	-
BMM5803-3/2	Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/03/2015	15/04/2015	60	4	83	C	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 08/10/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 14/05/2017 22:13:27

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6945203/2 - Juliana Coutinho Campos

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
5844522	Jorge Luiz Mello Sampaio	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 14/05/2017 22:13:27