UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi-
Metallo- β -Lactamase**

Bruna Mara Silva Seco

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2016

Bruna Mara Silva Seco

Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi-Metalo- β -Lactamase

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de MESTRE.**

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

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

S445p Seco, Bruna Mara Silva
Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do
tipo New-Delhi-Metalo- β -Lactamase / Bruna Mara Silva Seco. --
São Paulo, 2016.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia
médica I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

616.01 CDD

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Mara Silva Seco

**Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi-
Metallo- β -Lactamase**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
Orientador / Presidente

1° examinador

2° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **minha mãe**, que mesmo presente em alma, me incentivou a estudar e a lutar por objetivos maiores.

Ao **meu pai**, que acredita em minhas ações e me incentiva a continuar.

À **minha madrastra**, que em momentos de dificuldade soube me ajudar a encontrar o equilíbrio.

À **minha avó**, que me criou e educou para a vida.

Aos **meus irmãos**, pelo amor infinito, mesmo durante a distância.

Ao **meu namorado**, pelo amor necessário em momentos de dificuldade.

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

AGRADEÇO...

À **Deus**, pela sabedoria, força e a vida.

Aos **meus familiares**, pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sem vocês eu não teria conseguido chegar onde estou. Amo vocês!

Ao **Profº. Dr. Jorge Sampaio**, uma pessoa de caráter incontestável. Agradeço pela oportunidade e pela confiança em meu potencial. Obrigada por acreditar em mim e por me ajudar em meu amadurecimento profissional. Minha eterna gratidão.

À técnica, **Fabiana Teixeira**, 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: Juliana, Mayne, Flávia, Darlan, Elaine, Hadassa, Letícia.

Ao **Instituto Fleury** por disponibilizar os isolados 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.

“The important thing is to not stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day”.

Albert Einstein

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: documento eletrônico e impresso - Parte I (ABNT). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro e colaboradores. 2ª ed. revisada e ampliada. São Paulo, 2009.

RESUMO

SECO, B.M.S., 2016. **Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi-Metalo- β -Lactamase**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As metalo- β -lactamases (MBL) são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, a classe de antimicrobianos com maior potência para o tratamento de infecções graves e de maior uso clínico. Dentre as MBL, o grupo mais recentemente descrito e que apresentou rápida disseminação em todo o mundo é o da New-Delhi-Metalo- β -lactamases (NDM). Nas enterobactérias, os genes que codificam essas enzimas estão mais frequentemente localizados em plasmídeos. O estudo da estabilidade de plasmídeos que albergam o gene *bla*_{NDM-1} é importante para entender a predominância de espécies que carregam esses plasmídeos, desvendar mecanismos moleculares envolvidos na sua persistência e para desenvolver novas drogas que possam diminuir a sua persistência. Estudos recentes sobre estabilidade plasmidial evidenciaram que a maprotilina é capaz de induzir perda plasmidial de até 90% em *E. coli* K12. Neste trabalho, foi estudado o efeito da maprotilina na indução de cura de plasmídeos, que albergam o gene *bla*_{NDM-1}, em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*. Nove isolados pertencentes a diferentes espécies foram incluídas no estudo. Os plasmídeos foram caracterizados quanto ao seu tamanho por eletroforese e por sequenciamento de DNA no sistema Illumina. A persistência plasmidial foi determinada pelo método de contagem em placa

em LB ágar com e sem tratamento com maprotilina em concentrações sub-inibitórias (50mg/L). O experimento foi conduzido por 10 dias, representando aproximadamente 100 gerações. Neste estudo evidenciou-se que o grupo das enterobactérias estão envolvidas na disseminação de plasmídeos com *bla*_{NDM-1}, sendo que plasmídeos do grupo IncF estão mais relacionados a essa dispersão. A maprotilina teve efeito de cura plasmidial em todos os isolados exceto em *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii*. O isolado *P. rettgeri* apresentou maior taxa de perda plasmidial e a análise comparativa da sequência nucleotídica do plasmídeo indicou que a presença da IS5 pode estar relacionada com a diminuição da persistência plasmidial. Diferenças na persistência plasmidial, quando tratados com maprotilina, entre *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” e *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” sugerem que *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” pode ser um possível disseminador de plasmídeos albergando *bla*_{NDM-1}, devido a processos de adaptação co-evolutivos.

Palavras-chaves: *Enterobacteriaceae*, *bla*_{NDM-1}, carbapenemase, plasmídeo, maprotilina.

ABSTRACT

SECO, B.M.S., **Persistence of plasmids that encodes New-Delhi-Metalo- β -lactamase** Thesis (Master's degree) –School of Pharmacy, São Paulo University, São Paulo, 2016.

Metallo- β -lactamases (MBL) are able to hydrolase carbapenems, an antimicrobial class in clinical use with high potency in the treatment of severe infections. The most recently described group of MBL is the New-Delhi-Metallo- β -lactamases (NDM). This group is mostly correlated to the spread of resistance mediated by plasmid in *Enterobacteriaceae*. Understanding the plasmid persistence pattern is important in order to understand the predominance of a given species related to antimicrobial resistance plasmids spread, to unveil molecular mechanisms involved in the increase of plasmid persistence and to develop new drugs which could decrease its persistence. Recent studies have associated maprotiline to a decrease in 90% of plasmid persistence in *E. coli* K12. In this work, we evaluated the effect of maprotiline in curing plasmids carrying *bla*_{NDM-1} in different species of *Enterobacteriaceae*. Nine isolates belonging to different species were evaluated. Plasmids were characterized by agarose gel electrophoresis and by DNA sequencing with Illumina platform. The plate counting method was used to determine plasmid persistence, with and without sub-inhibitory (50 mg/L) concentration of maprotiline during 10 days, representing approximately 100 generations. We found that *Enterobacteriaceae* are involved in the spread of NDM-1 plasmid-mediate resistance and the IncF group is the plasmid incompatibility group more frequently involved in this dissemination.

Maprotiline showed a plasmid-curing effect in all isolates, except against plasmids of *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” and *C. freundii*. The *P. rettgeri* isolate had the highest plasmid-curing rate. Sequencing analysis revealed an IS5 in the plasmid, which could be associated to a decrease in plasmid persistence. The difference between plasmid persistence pattern of plasmids isolated from *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” and *E. hormaechei* “subsp. *oharae*”, when treated with maprotiline, suggest that *E. hormaechei* “subsp. *oharae*”, could be associated to the spread of plasmids carrying *bla*_{NDM-1} due to co-evolution adaptation.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, *bla*_{NDM-1}, carbapenemase, plasmid, maprotiline

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Importância Clínica	13
1.2	Antimicrobianos β -lactâmicos: mecanismos de ação e resistência	14
1.3	β -lactamases	17
1.3.1	Nova-Deli-Metalo- β -lactamase (NDM)	20
1.4	Plasmídeos e a disseminação da resistência aos antimicrobianos	25
1.5	Persistência plasmidial: mecanismos moleculares	28
1.5.1	Conjugação	28
1.5.2	Replicação plasmidial	30
1.5.3	Segregação plasmidial	32
1.5.4	Sistema toxina-antitoxina	34
1.5.5	Inserções e deleções gênicas	35
1.6	Grupos de Incompatibilidade	37
1.7	Cura plasmidial	39
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivos Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Amostras bacterianas	43
4.2	Extração de DNA genômico	43
4.3	Identificação de espécies bacterianas	44
4.4	Deteção do gene <i>bla</i> _{NDM-1}	44
4.5	Preparo de células eletrocompetentes	45
4.6	Extração de DNA plasmidial	46

4.7	Transformação em <i>Escherichia coli</i> TOP10 por eletroporação	47
4.8	Perfil plasmidial dos isolados bacterianos	47
4.9	Sequenciamento de plasmídeos	48
4.10	Análise do sequenciamento	48
4.11	Determinação de grupos de incompatibilidade	49
4.12	Ensaio de persistência plasmidial	49
4.13	Análise de dados dos ensaios de persistência plasmidial	51
4.14	Teste de Susceptibilidade a Maprotilina	52
4.15	Avaliação do efeito da maprotilina no crescimento celular	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Isolados bacterianos	53
5.2	Amostras albergam o gene <i>bla</i> _{NDM-1}	54
5.3	Plasmídeos carregam o gene <i>bla</i> _{NDM-1}	54
5.4	Maprotilina não afeta parâmetros do crescimento bacteriano	57
5.5	Persistência plasmidial	59
5.6	Plasmídeo de menor persistência possui uma sequência de inserção a mais do que plasmídeos de alta persistência	62
5.7	Grupos de Incompatibilidade	66
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância Clínica

As betalactamases são enzimas que conferem resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e são frequentemente detectadas em espécies da família *Enterobacteriaceae*. Dentre as betalactamases, as de maior importância clínica são as carbapenemases, por degradarem a classe mais utilizada no tratamento empírico das infecções graves por bacilos Gram-negativos: os carbapenêmicos. As espécies que expressam esse mecanismo de resistência, mais frequentemente isoladas em amostras de origem clínica, são *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. (CUZON et al., 2010; RUBIN et al., 2014; ZUJIC ATALIC et al., 2014a;2014b). Geralmente estão associadas a infecções do trato urinário, pneumonia nosocomial e infecções intra-abdominais em todo o mundo (CALLEFI; MEDEIROS; FURTADO, 2013; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Isolados produtores de carbapenemases são parte de um grande grupo designado ERC (Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos). As ERC são consideradas o maior problema de Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) em todo o mundo, em função da expressão simultânea de outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos (CALLEFI et al., 2013; LIVERMORE, 2012).

A alta resistência aos antimicrobianos está relacionada principalmente com a dispersão e transferência de plasmídeos que albergam genes de resistência do tipo *bla_{NDM}*, ou *bla_{KPC}* além de outros genes que conferem resistência a diferentes classes de

antimicrobianos como fluorquinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol ou rifampicina. Isso resulta em um fenótipo de multirresistência e num grande problema quanto à escolha do tratamento empírico das infecções causadas por esses microrganismos, já que os carbapenêmcios são os antimicrobianos com maior espectro e potência atualmente disponíveis para uso clínico (CANTON et al., 2012; RUBIN et al., 2014).

Há também uma grande preocupação sobre o controle da disseminação da resistência aos carbapenêmicos no ambiente, sendo que uma mobilização para a redução da colonização do trato digestório de pacientes que não estão em uso de antimicrobiano poderia secundariamente reduzir sua disseminação no meio ambiente e no ambiente hospitalar (WOODFORD et al., 2014).

1.2 Antimicrobianos β -lactâmicos: mecanismos de ação e resistência

Penicilina, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações, oxacilinas e carbapenêmicos são exemplos de fármacos pertencentes à classe dos antimicrobianos β -lactâmicos. São amplamente utilizados na prática clínica em todo o mundo, pois apresentam dois fatores importantes: alta eficácia e baixa toxicidade (NIKAIDO, 2009; PATERSON, 2006).

O mecanismo de ação desta classe de antimicrobianos é a inibição de 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 tem

importante função na transpeptidação e transglicosilação durante a síntese do peptidoglicano (SAMPAIO, 2007).

Figura 1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos. 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 NAM e NAG no sítio ativo da enzima, interrompendo a transpeptidação da cadeia causando falha na produção de parede celular e posteriormente morte celular. Figura modificada de Wikimedia Commons: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Penicillin_inhibition.svg> (domínio público).

Para atingir o espaço periplasmático, no qual estão localizadas as PBP's, os β -lactâmicos utilizam principalmente proteínas de membrana que formam canais de transporte: as porinas (WINN, 2001). Uma vez no espaço periplasmático, o agente β -lactâmico, o qual constitui um análogo estereoquímico do segmento ativo das PBPs, liga-se ao sítio ativo dessas 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 (SAMPAIO, 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 (TAVARES, 1996). Em 1979, um derivado estável foi isolado e tornado disponível comercialmente, denominado inicialmente de N-formimidoil-tienamicina, atualmente, conhecido como imipenem. A grande desvantagem deste fármaco é a de sofrer hidrólise do anel β -lactâmico por uma enzima renal, a dipeptidase, o que reduz significativamente a meia-vida do fármaco. Na tentativa de diminuir a ação desta enzima, a cilastatina foi descoberta e resolveu esta questão pela sua alta afinidade com a dipeptidase, impedindo o metabolismo renal do imipenem, podendo o mesmo atingir alta concentração urinária. 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 sua molécula possui um radical metila, associado ao carbono 1, que a protege da ação 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; JONES, 1997).

O aumento do uso desses antimicrobianos como primeira linha de tratamento contra infecções graves, particularmente aquelas causadas por enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro ampliado (ESBL) contribuiu como pressão seletiva para disseminação de bacilos Gram-negativos 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, transposições e integração de elementos genéticos (NIKAIDO, 2009). Esses novos genes podem estar localizados tanto em cromossomos bacterianos como em plasmídeos ou transpósons.

Basicamente existem quatro mecanismos pelos quais bactérias tornam-se resistentes aos antimicrobianos: (1) modificação do canal de entrada; (2) modificação da proteína alvo; (3) aumento da expressão de bombas de efluxo; (4) produção de enzimas que degradam o antimicrobiano, essas conhecidas como β -lactamases. O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais frequente e mais eficiente em enterobactérias é a produção de β -lactamases. Nas enterobactérias a localização dessas enzimas no espaço periplasmático aumenta sua eficiência (BUSH, 2001).

1.3 β -lactamases

Uma vez que β -lactâmicos são produzidos por microrganismos no ambiente, a produção de β -lactamases por outras bactérias representa uma vantagem competitiva em nichos ecológicos. Essas enzimas são codificadas por genes presentes em cromossomos ou plasmídeos. A mobilidade gênica pode ainda ser aumentada por meio de transpósons, genes “saltadores” que fazem a transferência de genes cromossômicos para plasmídeos, e a partir destes, são disseminados em uma população bacteriana (BUSH; JACOBY, 2010).

Diferentes enzimas já foram descritas e são atualmente classificados por diferentes autores de acordo com estrutura molecular ou substrato preferencial entre o grupo das penicilinas, oxacilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro ampliado

e a susceptibilidade à inibição por clavulanato. Segundo Ambler, as enzimas são classificadas nos grupos A, B, C ou D com base na estrutura molecular e homologia na sequência dos aminoácidos (AMBLER, 1980). Entretanto, Bush e Jacob dividem essas enzimas de acordo com seu grupo funcional e perfil inibitório (BUSH, 2013).

Figura 2. Classificação das enzimas β-lactamases. Classes moleculares foram baseadas na nomenclatura de Ambler. Grupos funcionais foram baseados na nomenclatura proposta por Bush. Abreviações: AC- Ácido Clavulânico, EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético. Modificado de (BUSH, 2013).

A classe B de Ambler engloba as enzimas que possuem zinco em seu sítio ativo e são frequentemente isoladas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e Enterobactérias. As outras classes A, C ou D de Ambler apresentam um resíduo de serina no seu sítio ativo e são isoladas principalmente de enterobactérias e *Acinetobacter* spp (BUSH, 2013).

A classe C de Ambler (grupo 1 de Bush) corresponde ao grupo das cefalosporinases que hidrolisam todos os betalactâmicos exceto carbapenêmicos, e que não são inibidas pelo ácido clavulânico, um inibidor de β -lactamases. Como principais enzimas observamos a AmpCs (BUSH, 2013).

Na classe A de Ambler (grupo 2 de Bush) foram incluídas uma grande variedade de enzimas que se dispõem em vários subgrupos de acordo com o seu perfil de substrato, como KPC, SME, GES e as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). As ESBLs hidrolisam cefalosporinas e monobactâmicos, mas não cefamicinas ou carbapenêmicos (BUSH, 2013).

As oxacilinases da classe D de Ambler (grupo 2 de Bush) também hidrolisam antimicrobianos carbapenêmicos, porém sua prevalência em Enterobactérias é inferior àquela observada em *Acinetobacter* spp. Essas enzimas frequentemente são codificadas por genes inseridos em plasmídeos (BUSH, 2013).

Na classe B de Ambler (grupo 3 de Bush) estão incluídas as metalo- β -lactamases (MBLs), enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e por isso designadas também de carbapenemases. Ao contrário das carbapenemases incluídas em outros grupos, as metalo-betalactamases não são inibidas pelos inibidores de betalactamases atualmente em uso clínico e não hidrolisam os monobactâmicos; entretanto são inibidas por quelantes de cátions divalentes, a exemplo do EDTA ou do ácido dipicolínico (KIMURA; ISHII; YAMAGUCHI, 2005), sendo isoladas principalmente em Enterobactérias e *Acinetobacter* spp. (BUSH, 2013).

1.3.1 New Delhi Metallo β -lactamase (NDM)

As enzimas do tipo NDM possuem duas moléculas de zinco no seu sítio ativo, por isso são classificadas dentro do grupo B de Ambler como Metallo β -lactamase (MBL) (AMBLER, 1980). Seu primeiro relato no mundo ocorreu na cidade de New Delhi na Índia, em um paciente apresentando abscesso glúteo. Esse paciente retornou para Suécia, local de residência, na qual uma cultura de urina evidenciou um isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e positivo para testes de MBL. Testes adicionais confirmaram a presença de um novo mecanismo de resistência presente em um plasmídeo de aproximadamente 180 Kb (YONG et al., 2009). O nome da cidade de New Delhi mais a classe à qual a enzima pertence deu então origem ao seu nome: New Delhi Metallo β -lactamase (NDM).

A relevante importância de patógenos produtores de NDM é a de apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos, incluindo os novos inibidores de betalactamases, ativos contra KPC (BIEDENBACH et al., 2015; KUMARASAMY et al., 2010).

O β -lactâmico aztreonam não consegue ser clivado por MBL's, pois não interage com o sítio ativo da enzima; desta forma pode apresentar atividade contra cepas produtoras de NDM se o isolado não possuir outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos (LIVERMORE et al., 2011).

Recentes estudos comparativos de modelos de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* sugerem que cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima, carbapenêmicos e aztreonam associados ao avibactam podem ter atividade contra cepas produtoras de

NDM no tratamento clínico, indicando uma discordância com ensaios *in vitro* (ZMARLICKA; NAILOR; NICOLAU, 2015).

. Após seu primeiro isolamento, *bla*_{NDM} foi identificado em diversas regiões do mundo (Figura 3): Paquistão, Reino Unido (KUMARASAMY et al., 2010), Austrália (POIREL et al., 2010), Dinamarca (HAMMERUM et al., 2010), Alemanha (GOTTIG et al., 2010), Cingapura (KOH et al., 2010), Taiwan (WU et al., 2010), Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE; PREVENTION, 2010), França (BIRGY et al., 2011), Bélgica (BOGAERTS et al., 2011), China (CHEN, Y. et al., 2011), Itália (D'ANDREA et al., 2011), África do Sul (LOWMAN et al., 2011), Canadá (PEIRANO et al., 2011), Marrocos (POIREL; BENOUDA; et al., 2011), Quênia (POIREL; SCHRENZEL; et al., 2011), Suíça (POIREL; REVATHI; et al., 2011), Espanha (SOLE et al., 2011), Argélia (BOULANGER et al., 2012), Afeganistão (MCGANN et al., 2012), República Checa (NEMEC; KRIZOVA, 2012), Vietnã (ISOZUMI et al., 2012), Croácia (MAZZARIOL et al., 2012), Irlanda (MCDERMOTT et al., 2012), Guatemala (PASTERAN et al., 2012), Turquia (POIREL; OZDAMAR; et al., 2012), Tailândia (RIMRANG et al., 2012), Rússia (BARANTSEVICH et al., 2013), México (BARRIOS et al., 2013), Brasil (CARVALHO-ASSEF et al., 2013), Colômbia (ESCOBAR PEREZ et al., 2013), Israel (GEFEN-HALEVI et al., 2013), Grécia (GIAKKOUPIS et al., 2013), Japão (NAKAZAWA et al., 2013), Romênia (SZEKELY et al., 2013), Iêmen (GHAROUT-SAIT et al., 2014), Portugal (MANAGEIRO et al., 2015), Coreia (SUNG et al., 2015), Cuba (QUINONES et al., 2015), Egito (El-Sayed-Ahmed MA, 2015).

Figura 3. Países nos quais bactérias positivas para NDM foram reportadas, até o presente estudo.

O primeiro caso de NDM-1 no Brasil foi relatado no Rio Grande do Sul, sendo o isolado uma *Providencia rettgeri*, cultivado de um fragmento de tecido de um paciente diabético com infecção no pé (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Os relatos de caso de NDM em todo o mundo incluem isolados de pacientes que foram recentemente à Índia ou Paquistão, mas também pacientes que nunca viajaram para fora de seu país de origem ou tiveram contato com pessoas que previamente viajaram para o exterior. Até o momento, 16 variantes da enzima já foram descritas (Tabela 1) e sua classificação é baseada na composição dos aminoácidos (JACOBY, 2014; YONG et al., 2009).

Tabela 1. Enzimas β -lactamases do tipo NDM descritas até o presente estudo. Adaptado de (<http://www.lahey.org/studies/other.asp>, 2016).

Gene	Espécie	Nº GenBank
<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FN396876
<i>bla</i> _{NDM-2}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JF703135
<i>bla</i> _{NDM-3}	<i>Escherichia coli</i>	JQ734687
<i>bla</i> _{NDM-4}	<i>Escherichia coli</i>	JQ348841
<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>Escherichia coli</i>	JN104597
<i>bla</i> _{NDM-6}	<i>Escherichia coli</i>	JN967644
<i>bla</i> _{NDM-7}	<i>Escherichia coli</i>	JX262694
<i>bla</i> _{NDM-8}	<i>Escherichia coli</i>	AB744718
<i>bla</i> _{NDM-9}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KC999080
<i>bla</i> _{NDM-10}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KF361506
<i>bla</i> _{NDM-11}	<i>Escherichia coli</i>	KP265939
<i>bla</i> _{NDM-12}	<i>Escherichia coli</i>	AB926431
<i>bla</i> _{NDM-13}	<i>Escherichia coli</i>	LC012596
<i>bla</i> _{NDM-14}	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	KM210087
<i>bla</i> _{NDM-15}	<i>Escherichia coli</i>	KP735848
<i>bla</i> _{NDM-16}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP86282

O gene *bla*_{NDM} tem sido comumente encontrado em plasmídeos da família IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1, IncN, IncK, IncX em Enterobactérias (CAMPOS et al., 2015; CARATTOLI, 2013), enquanto que em espécies de *Acinetobacter baumannii* o gene se encontra principalmente em cromossomo (CHEN, Y. et al., 2011) com apenas um caso relatado em plasmídeo até o momento (PILLONETTO et al., 2014). A disseminação deste gene por plasmídeos está associada a outras espécies deste gênero (FU et al., 2012; JOHNSON, A. P.; WOODFORD, 2013; YANG, J. et al., 2012).

A caracterização dos genes *bla*_{NDM} e seu entorno mostra um quadro altamente complexo, pois *bla*_{NDM} foi encontrado em uma grande variedade de espécies e gêneros de bactérias Gram-negativas e em uma diversidade de clones em uma mesma espécie (JOHNSON, A. P.; WOODFORD, 2013). Além disto, o gene *bla*_{NDM} pode estar inserido

entre duas repetições diretas do elemento *ISAb_a125*, formando um transpóson composto (*Tn125*) (BONNIN et al., 2012; BOULANGER et al., 2012; ESPINAL et al., 2011; HRABAK et al., 2012; KAASE et al., 2011; KARTHIKEYAN; THIRUNARAYAN; KRISHNAN, 2010; PFEIFER et al., 2011; POIREL; BONNIN; et al., 2012), ou entre duas repetições do elemento *IS3000*, formando o transpóson *Tn3000* de aproximadamente 11.000 pb (CAMPOS et al., 2015).

O transpóson *Tn125* em isolados de *A. baumannii* e enterobactérias mostra a presença de um novo gene de resistência denominado de *ble_{MBL}* (gene *ble* associado com a metalo-β-lactamase NDM), que causa resistência à bleomicina. Os genes *bla_{NDM}* e *ble_{MBL}* são co-expressos pelo mesmo promotor localizado anteriormente ao gene *bla_{NDM}* na extremidade *ISAb_a125* (Figura 4B) (DORTET; NORDMANN; POIREL, 2012).

O transpóson *Tn3000* possui duas cópias da *IS3000*. A primeira cópia trunca a porção 5' da *ISAb_a125* acima da posição do gene *bla_{NDM-1}*. O gene *ble_{MBL}* está presente subsequente ao gene *bla_{NDM-1}* seguido dos genes que codificam a isomerase fosforibosilantranilato (*trpF*), a proteína sinalizadora da translocação da twin-arginina (*tat*), o gene da proteína divalente tolerante a ferro (*cutA1*), o gene do *groEL* e *groES*, que também fazem parte da estrutura do *Tn125*. Entretanto, o gene *groEL* encontra-se truncado na porção 3' da segunda cópia do *IS3000* (Figura 4A) (CAMPOS et al., 2015).

Dessa forma, é evidente que elementos móveis como plasmídeos e transpósons estão envolvidos na dispersão deste mecanismo de resistência, e esta dispersão ocorre entre diferentes grupos de bactérias (CAMPOS et al., 2015; DORTET et al., 2012).

Figura 4. Tranpósons que albergam gene *bla*_{NDM-1} (seta). A- Transpósón Tn3000 do plasmídeo pEh1A isolado de *E. hormaechei* do Rio de Janeiro. B- Transpósón Tn125 encontrado em cromossomo de *Acinetobacter lwoffii* e que também faz parte de estrutura de plasmídeos que albergam o gene *bla*_{NDM-1}. Modificado de (CAMPOS et al., 2015; SUN et al., 2015).

1.4 Plasmídeos e a disseminação da resistência aos antimicrobianos

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 (EGGLESTON; ZHANG; ZECKHAUSER, 2010; GILLINGS, 2013; NORMARK; NORMARK, 2002; PEREIRA et al., 2013; PERRY; 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 (DE LA CRUZ et al., 2010; DIONISIO et al., 2002; GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003; SMILLIE 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 et al., 2011).

Um dos fatores que contribuem para a disseminação de cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos é a estabilidade dos diferentes plasmídeos nas diferentes espécies bacterianas. A interferência de condições ambientais que podem afetar a persistência de plasmídeos na ausência de antibióticos ainda não está clara entre os diversos grupos (SMILLIE et al., 2010). Estudos mostraram que a frequência de resistência aos antibióticos em populações bacterianas, na ausência de seleção com antibióticos, é reduzida rapidamente. Entretanto outros estudos mostram que nem sempre essa redução ocorre (DE GELDER et al., 2007; DE GELDER et al., 2005; DE GELDER et al., 2008; DIONISIO et al., 2005; PONCIANO et al., 2007).

A persistência plasmidial em populações bacterianas está relacionada a três fatores principais: (1) a estabilidade na transferência do plasmídeo durante a divisão celular; (2) a reinfecção de indivíduos através da conjugação de plasmídeos que são transferíveis em segregantes que não possuem plasmídeo; (3) a competição entre

células com plasmídeos e células sem plasmídeos, nas quais as células com plasmídeos são desfavorecidas na ausência de seleção devido ao custo metabólico da manutenção do plasmídeo, afetando seu estabelecimento na população (Figura 5) (BERGSTROM; LIPSITCH; LEVIN, 2000; SLATER et al., 2008).

Figura 5. O estabelecimento plasmidial em uma população bacteriana é dependente da combinação de dois processos de transmissão: a- vertical b-horizontal; e processos de pressão seletiva (c e d). Plasmídeos serão mantidos em uma população se a taxa de perda via segregacional (a) e o efeito negativo no crescimento da célula hospedeira causado pelo custo metabólico para manutenção do plasmídeo na ausência de seleção (c), for igual à taxa de transmissão via horizontal (b) e efeito positivo no crescimento de células hospedeiras que albergam de plasmídeo que conferem benefício fenotípico na presença de seleção. Modificado de (SLATER et al., 2008).

Esses fatores são comandados por pelo menos quatro mecanismos moleculares, entre eles: eficiência na replicação do plasmídeo, resolução de problemas de plasmídeos

conectados, eficiência na distribuição de plasmídeos funcionantes durante divisão celular e eliminação pós-segregacional de plasmídeos livres (SLATER et al., 2008).

Estudos mostram que certos plasmídeos podem apresentar diferentes padrões de estabilidade em diferentes bactérias Gram-negativas, e até mesmo entre diferentes cepas de mesma espécie (DE GELDER et al., 2007; SOTA et al., 2010). Os mecanismos pelos quais esses fatores atuam não estão bem definidos, porém sabe-se que interação plasmídeo-hospedeiro é necessária para a manutenção da persistência plasmidial (DE GELDER et al., 2008; SOTA et al., 2010).

1.5 Persistência plasmidial: mecanismos moleculares

Existem mecanismos moleculares que modulam a persistência plasmidial. Entre eles: conjugação, eficiência na replicação e segregação, fatores pós-segregacionais, inserções e deleções gênicas, são de extrema importância para a manutenção do plasmídeo, pois interferem diretamente na sua perpetuação em uma população bacteriana (BERGSTROM et al., 2000; SLATER et al., 2008).

1.5.1 Conjugação

Conjugação é um processo pelo qual o material genético é transferido de uma célula doadora para uma célula receptora. Essa transferência exige uma sofisticada maquinaria gênica para garantir a mobilização do DNA (DE LA CRUZ et al., 2010; GARCILLAN-BARCIA; FRANCIA; DE LA CRUZ, 2009; KLIMKE; FROST, 1998).

Em bactérias Gram-negativas, a conjugação depende da formação do pilus na célula doadora que é guiada pelo sistema de secreção do tipo IV (T4SS), chamado de transferossomo. Este complexo expande o envelope celular e está envolvido na formação e retração do pilus, na identificação da célula receptora e na sinalização para o início do processo de transferência do DNA (DE LA CRUZ et al., 2010).

O complexo de nucleoproteínas envolvidas no processamento do DNA e na formação do transferossomo é chamado de relaxossomo (FURSTE et al., 1989). É formado por relaxases (BYRD; MATSON, 1997) e proteínas auxiliares que se ligam à região de origem de transferência (*oriT*). Na região *oriT*, ocorre a formação de um sítio de “nic” onde a relaxase fosfodiesterase, quebra a fita de DNA em locais específicos, resultando na transferência de DNA fita simples 5'→3' para a célula receptora (KLIMKE; FROST, 1998).

Outras proteínas são necessárias para que a transferência do DNA ocorra, entre elas a proteína acopladora T4CP que conecta o relaxossomo ao T4SS, formando um canal, conhecido como poro conjugativo, na qual o DNA é encaminhado para a célula receptora (GOMIS-RUTH et al., 2004).

Esses mecanismos moleculares guiam um processo extremamente essencial na transferência de plasmídeos que albergam genes de resistência. A reinfecção de células livres de plasmídeos, através da conjugação, aumenta a persistência plasmidial mesmo quando erros de replicação ou segregação ocorrem na célula hospedeira (SLATER et al., 2008).

1.5.2 Replicação plasmidial

Plasmídeos possuem em seu arcabouço genético regiões que regulam sua replicação. Essas regiões possuem diferentes genes e sequências específicas que são essenciais neste processo, entre elas a origem de replicação (*ori*), proteínas responsáveis pelo início da replicação (Rep) e diferentes genes para o controle da replicação. O controle da replicação pode ocorrer via RNA anti-senso, bloqueio da tradução de proteínas Rep, ou atenuação da transcrição dos genes essenciais (DEL SOLAR et al., 1998).

A origem de replicação (*ori*) é o local no qual a interação proteína-DNA acontece e é essencial para que a replicação se inicie. Essa mesma região é de extrema importância, pois é a base para a classificação de diferentes tipos de replicons. Existem três mecanismos de replicação principais: replicação pelo mecanismo Teta, replicação por deslocamento de filamento e replicação por círculo rolante. No mecanismo teta e deslocamento de filamento, existe a formação de uma forquilha de replicação a partir da *ori* e a replicação ocorre bidirecionalmente; enquanto que no círculo rolante, a replicação ocorre unidirecionalmente (DEL SOLAR et al., 1998).

Outro fator importante para que a replicação ocorra é a forma na qual plasmídeos se encontram dentro das células bacterianas. Plasmídeos são estruturas de DNA circular e sua forma super-helicoidal favorece a sua replicação e segregação, pois esta conformação possui uma energia de torção negativa causada pelo alto enovelamento do DNA (KASAMATSU; VINOGRAD, 1974). Essa tensão negativa facilita a separação de fitas, pois este processo alivia o estresse causado pelo enovelamento do DNA, ocorrendo

com um menor custo metabólico. Desta forma, a quantidade de energia gasta para replicar e segregar plasmídeos super-helicoidais é menor do que aquela necessária para o mesmo processo em plasmídeos em formas relaxadas (GELLERT et al., 1976).

O super-enovelamento do DNA traz problemas como formação de nós entre as fitas de DNA bem como quebras que precisam de reparo. Desta forma, as topoisomerases são necessárias para reparar o DNA. O grupo mais importante no processo de enovelamento e reparos é o grupo das topoisomerases do tipo II, pois conseguem quebrar ambas as fitas de DNA. Em Eubactérias esse grupo é representado por duas enzimas: DNA girase e topoisomerase IV (MORRISON; COZZARELLI, 1981).

Embora as topoisomerases tipo II sejam eficientes, o processo é altamente custoso devido a essas enzimas estarem acopladas a ATPases que hidrolisam o ATP para fornecer energia no processo de enovelamento. Para solucionar este problema, bactérias codificam também as topoisomerases do tipo I, que não necessitam da hidrólise do ATP para exercer sua atividade. Em bactérias existem duas enzimas deste grupo: a Topo I e Topo III. A ação das topoisomerases do tipo I ocorre somente em DNA super-enovelados, pois ela é dependente de um gradiente energético, que é gerado pela energia negativa armazenada em plasmídeos super-enovelados (WITZ; STASIAK, 2010).

Outro fato importante, é a redução do gasto energético por apresentar plasmídeos super-enovelados. A ação das topoisomerases do tipo IV não acontece em plasmídeos nesta forma, pois existe uma dificuldade da enzima em separar as duas fitas de DNA. Desta forma o consumo e ATP gerado em processos e reparo de DNA é diminuído (WITZ; STASIAK, 2010).

Qualquer interação que ocorra de forma não regulada nas regiões *ori*, ou iniba a expressão de genes que codifiquem proteínas Rep ou de controle de replicação, bem como genes da topoisomerase, podem afetar mecanismos de replicação plasmidial e sua distribuição para células filhas, diminuindo a persistência do mesmo em uma população bacteriana (BERGSTROM et al., 2000; SLATER et al., 2008).

1.5.3 Segregação plasmidial

Outra forma de manutenção plasmidial é através da transmissão vertical na qual o plasmídeo é transmitido para as células-filhas durante a divisão celular, processo conhecido como segregação plasmidial ou partição. Este processo é mediado por mecanismos moleculares ou randomizados, baseados em número de cópias de plasmídeo por célula (MILLION-WEAVER; CAMPS, 2014).

O sistema de partição plasmidial ocorre em plasmídeos de baixo número de cópias e normalmente carrega os genes essenciais em seu arcabouço gênico. Esses genes codificam proteínas essenciais para a divisão física de plasmídeos em números iguais para células filhas. Exemplos são os sistemas *Par*, que são encontrados em gamaproteobactérias (*parRMC*), α -proteobacteria (*parABC*) e plasmídeos F conjugativos (*sopABC*) (SALJE, 2010; THOMAS, 2000). Este sistema conta com a formação de um elemento centromérico, uma proteína motora que gera energia através da hidrólise do nucleotídeo trifosfato e uma proteína de ligação do DNA que atua como um adaptador entre a proteína motora e o centrômero (MILLION-WEAVER; CAMPS, 2014).

Para que a partição ocorra, muitas proteínas e genes estão envolvidos. No sistema *parRMC* do plasmídeo R1, um exemplo do sistema *par* tipo II, os plasmídeos se encontram ao acaso e começam a se mover como uma unidade única devido a ligação do ParR com o gene *parC*. Monômeros de ParM são adicionados ao final do filamento do ParR e ocorre uma elongação bidirecional, empurrando os plasmídeos para polos opostos da célula. Após essa etapa, a hidrólise do ATP causa a dissociação do filamento ParM e os plasmídeos acabam em polos opostos da célula em divisão celular (Figura 6) (GERDES et al., 1986)

Figura 6. Sistema de partição *part* tipo II. (1) Plasmídeos se encontram ao acaso. (2) Plasmídeos se movem como uma única unidade devido a ligação do ParR (esfera preta) e *parC* (retângulo cinza). (3) Monômeros de ParM (retângulos brancos) são adicionados ao final do ParR. (4) A elongação da cadeia de ParM empurra os plasmídeos para polos opostos da célula. (5) Hidrólise do ATP quebra a cadeia de ParM. (6) Plasmídeos em polos opostos da célula bacteriana. Modificado de (MILLION-WEAVER; CAMPS, 2014).

Em plasmídeos que possuem grande número de cópias (>15 cópias/célula) o sistema de segregação ainda não foi bem esclarecido. Poucos estudos sugerem que a partição plasmidial ocorre de forma randômica, de forma que a probabilidade de formação de células livres de plasmídeo é muito pequena devido ao grande número de cópias de plasmídeo (REYES-LAMOTHE et al., 2014; SUMMERS, 1991). Outros

estudos sugerem que a divisão randômica de plasmídeos é facilitada por mecanismos de resolução de multímeros ou plasmídeos conectados, na qual são codificados principalmente por genes cromossômicos (MILLION-WEAVER; CAMPS, 2014).

1.5.4 Sistemas toxina-antitoxina

Entre os mecanismos pós-segregacionais, os sistemas toxina-antitoxina (TA) têm alta eficiência na eliminação de células livres de plasmídeos. O sistema TA garante a manutenção plasmidial, pois confere uma vantagem às células albergando plasmídeos porque reduz a competitividade com células livre de plasmídeos, garantindo sua retenção na população (HAYES, 2003; PARK et al., 2013).

O sistema TA está presente normalmente no arcabouço genético dos plasmídeos, mas também pode ser encontrado em cromossomo. O cassete gênico é normalmente formado pelo gene da antitoxina seguido do gene da toxina, porém existem casos na qual esta ordem pode estar invertida (ENGELBERG-KULKA; GLASER, 1999; GERDES, 2000; RAWLINGS, 1999).

O sistema funciona de uma maneira eficiente de modo a garantir apenas a sobrevivência de células que albergam o plasmídeo. O gene da toxina codifica uma proteína estável, enquanto o gene da antitoxina pode codificar uma proteína lábil ou um RNA antisense. A toxina pode ser neutralizada pela inibição da tradução, quando a antitoxina é um RNA (tipo I), pela ligação do RNAm da antitoxina à proteína da toxina (tipo III), ou ainda por uma ligação forte toxina-antitoxina (tipo II). Se uma célula-filha não recebe o plasmídeo, devido a um erro na replicação ou defeito na manutenção

plasmidial, as células continuarão a herdar o complexo toxina-antitoxina, presente no citoplasma. A antitoxina será degradada mais rapidamente por enzimas intrínsecas do que a toxina, e a mesma não será reposta, devido à falta dos genes plasmidiais que a codificam. Desta forma, a toxina é liberada do complexo toxina-antitoxina e interage com alvos essenciais da célula hospedeira causando morte celular ou restrição de crescimento (Figura 7) (DZIEWIT et al., 2007; HAYES, 2003).

Figura 7. Sistemas toxina-antitoxina. No tipo I há uma interação do RNAm da antitoxina com o RNAm da toxina. No tipo II existe a interação proteica da toxina com a antitoxina. No tipo III o RNAm da antitoxina interage com a proteína da toxina. Modificado de (PARK; SON; LEE, 2013).

1.5.5 Inserções e deleções gênicas

Estudos recentes sobre evolução de plasmídeos e hospedeiros têm indicado novos mecanismos que causam um aumento da sua persistência, através da inserção e/ou deleção gênica. Loftie-Eaton *et al*, 2015 realizando um experimento de co-evolução do plasmídeo pMS0506 no hospedeiro *P. moraviensis*, por 1.000 gerações, demonstrou que ocorrem mudanças genéticas no plasmídeo e no hospedeiro, em um processo co-

evolutivo. O sequenciamento do genoma do hospedeiro, quando comparado ao seu ancestral, mostrou polimorfismo de nucleotídeo único (SNP's) no promotor do gene da helicase DNAB e em uma helicase putativa, enquanto que o sequenciamento de plasmídeos, que aumentaram sua persistência, mostrou uma inserção de um transpóson de 7.1Kb (LOFTIE-EATON et al., 2015).

Plasmídeos que se adaptam a um hospedeiro podem também se tornar mais estáveis em outros hospedeiros filogeneticamente distintos, sem a necessidade de co-evolução com o novo hospedeiro. Um exemplo foi este mesmo plasmídeo pMS0506 que foi submetido a um processo de evolução em *P. moraviensis* e que adquiriu um transpóson de 7.1Kb do plasmídeo nativo pR28. O transpóson adquirido codifica um sistema toxina-antitoxina, que auxiliou na manutenção plasmidial não só em *P. moraviensis* como também em *E. coli*, *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida* (LOFTIE-EATON et al., 2015).

Processos de deleções também podem contribuir para o aumento da persistência plasmidial. *Pseudomonas fluorescens* e o plasmídeo pQBR103, resistente a mercúrio, foram submetidos a processos de evolução para verificar a persistência plasmidial em ambiente sem pressão seletiva. O sequenciamento completo do plasmídeo revelou deleções dos genes *gacA* ou *gacS*, responsáveis por produção de metabólitos secundários, diminuindo o custo da manutenção plasmidial na célula hospedeira. Mutações no *gacA/gacS* inibiram a expressão de 17% dos genes plasmidiais e cromossômicos, o que possivelmente reduziu o gasto metabólico que plasmídeos exigem da célula hospedeira (HARRISON et al., 2015).

Essas diferentes vias pelas quais plasmídeos podem aumentar sua persistência, tais como interações entre plasmídeo-plasmídeo, plasmídeo-hospedeiro ou ambos, demonstram que existem múltiplos mecanismos no processo de estabelecimento de um plasmídeo em uma população bacteriana (LOFTIE-EATON et al., 2015; PENA-MILLER et al., 2015).

.

1.6. Grupos de Incompatibilidade

Plasmídeos são classificados em grupos de incompatibilidade (Inc) baseado na condição de que plasmídeos de mesmo grupos de incompatibilidade não podem coexistir em uma única célula, devido a mecanismos de replicação em comum (NOVICK, 1987). Essa classificação é importante para agrupar plasmídeos que conferem resistência aos antimicrobianos e para entender a disseminação de plasmídeos de importância clínica (ANDERSON et al., 1977).

Grupos de Inc podem ser detectados de três formas distintas: (1) introdução do plasmídeo, do qual se desconhece o grupo de Inc, em uma célula que contenha um plasmídeo de grupo de Inc conhecido, por conjugação ou transformação e avaliação da estabilidade; (2) PCR para replicons de grupos Inc definidos; (3) Sequenciamento total ou parcial de plasmídeos e comparações de replicons *in silico* (CARATTOLI et al., 2005; CARATTOLI et al., 2014; NOVICK, 1987).

A resistência aos β -lactâmicos é disseminada por diferentes plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade, tais como: IncA/C, IncF, IncFII_k, IncHI2, IncHI3, IncL/M, IncN, IncN2, IncX e IncX3. A disseminação de *bla*_{NDM-1}, especificamente, vem

sendo associada a plasmídeos dos grupos IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1, IncX, IncFII_k e novas variantes dos grupos IncN, IncHI1, sendo os grupos IncA/C e IncHI1 os mais frequentemente reportados (CAMPOS et al., 2015; CARATTOLI, 2013).

A família IncA/C possui uma grande diversidade de hospedeiros pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., e outras bactérias distintas tais como *Photobacterium damsela*, sendo nomeados de plasmídeos promíscuos. Essa família codifica múltiplos genes de resistência como a aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, sulfonamidas e também genes importantes no sistema de segregação responsáveis pela persistência plasmidial (COLINON et al., 2007; POOLE et al., 2009). Esse grupo também está relacionado com a dispersão de genes de β -lactamase do tipo AmpC, em particular *bla*_{CMY-2} (LINDSEY et al., 2009).

O grupo IncHI1 é um grupo especial pelo fato desses plasmídeos estarem frequentemente associados a *Salmonella* spp. e sua transferência ocorrer preferencialmente entre 22°C e 30°C, sugerindo que a disseminação de *bla*_{NDM-1} para outros grupos de bactérias, ocorre preferencialmente em ambientes aquáticos e solo (DOLEJSKA et al., 2013; WALSH et al., 2012). Plasmídeos desse grupo frequentemente codificam metilases ArmA (resistência a todos os aminoglicosídeos) e resistência a metais pesados. Sequências do plasmídeo IncHI1 albergando *bla*_{NDM-1} em *Citrobacter freundii* revelaram um pró-fago do tipo CP4 que alberga genes codificadores de bomba de efluxo RND/MDR e do sistema toxina-antitoxina do tipo YkfI-YfjZ os quais podem estar relacionados com o aumento da resistência aos antimicrobianos e persistência plasmidial (DOLEJSKA et al., 2013).

1.7 Cura plasmidial

O desenvolvimento de novos fármacos contra cepas multirresistentes é necessário, porém é um processo muito lento quando comparado com a frequência de surgimento de mecanismos de resistência. Uma alternativa a isto tem sido o estudo da ação de compostos químicos que apresentam atividade de cura plasmidial como um mecanismo para a contenção da disseminação da resistência aos antimicrobianos (MOLNAR; AMARAL; MOLNAR, 2003; SPENGLER et al., 2006).

Diferentes compostos que apresentam atividade de cura plasmidial foram reportados na literatura. Entre os compostos naturais, o extrato herbal de naftoquinonas apresentou atividade de cura plasmidial de 4-20% em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (JAHAGIRDAR; PATWARDHAN; DHAKEPHALKAR, 2008), enquanto que o agente 8-epidiosbulbina E acetato (EEA) isolado da planta *Dioscorea bulbifera* curou plasmídeos de amostras clínicas como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa*, a uma taxa de 12-48% (SHRIRAM et al., 2008).

Entre os compostos intercalantes, o brometo de etídio e laranja de acridina são os mais utilizados em laboratórios para cura de plasmídeos em ensaio *in vitro*. Normalmente, os compostos químicos são adicionados ao meio de cultura junto com o inóculo bacteriano e cultivado *overnight*. Esses compostos induzem a cura plasmidial principalmente pela inibição do processo de replicação plasmidial (LETCHUMANAN; CHAN; LEE, 2015).

Compostos tricíclicos como as fenotiazinas e não-fenotiazinas também fazem parte da categoria de compostos intercalantes, e são fármacos conhecidos por serem usados no tratamento da depressão. O derivado da fenotiazina 2-Chloro-10-(2-dimethylaminoethyl) fenotiazina, curou plasmídeos lacF a uma taxa de 90% em *E. coli* K12. Outro derivado tricíclico, uma não-fenotiazina conhecida como maprotilina, também apresentou uma taxa de 90% de cura de plasmídeos lacF em *E. coli* K12. Esses fármacos são possíveis ferramentas que podem auxiliar no processo de eliminação de plasmídeos que albergam resistência a antimicrobianos devido à alta taxa de eliminação plasmidial (MOLNAR et al., 2003).

A eficácia destes compostos químicos depende da estrutura química da molécula com sistemas de anel plano com substituição na região L-molecular. A estrutura do DNA na qual os compostos se ligam também influencia sua eficiência. Plasmídeos super-helicoidais são mais susceptíveis à ligação de compostos químicos do que as formas lineares ou circulares abertas. Apesar da conhecida atividade anti-plasmidial de alguns compostos, estudos ainda são necessários para que os mesmos tenham elevada eficiência sobre plasmídeos de multirresistência e auxiliem na redução da dispersão de resistência aos antimicrobianos nos diferentes microbiomas. (SPENGLER et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A dispersão do gene *bla*_{NDM-1} vem acontecendo rapidamente, em bactérias filogeneticamente distintas, e já atinge diversas regiões no mundo. Esse processo vem ocorrendo principalmente através da mobilização de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transpósons.

Muito pouco se sabe sobre o comportamento desses plasmídeos em diferentes hospedeiros. O estudo da persistência plasmidial pode mostrar quão adaptados os plasmídeos são em relação ao seu hospedeiro, auxiliando na busca de um possível disseminador do gene *bla*_{NDM-1}, bem como o estabelecimento de padrões de estabilidade.

Entender os processos genéticos que auxiliam na manutenção plasmidial é de extrema importância para que esses mecanismos possam vir a ser utilizados no controle da dispersão de genes de resistência.

Outro fator importante é tentar diminuir a persistência de plasmídeos que carregam o gene *bla*_{NDM-1} utilizando-se fármacos que possuem atividade de cura plasmidial, de modo a criar uma alternativa ao uso dos antimicrobianos. Neste trabalho nós investigamos, pela primeira vez na literatura, a atividade do fármaco maprotilina na cura de plasmídeos com *bla*_{NDM-1}.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a persistência de plasmídeos que albergam *bla*_{NDM-1} em Enterobactérias.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer padrões de persistência plasmidial para diferentes espécies de Enterobactérias.
- Comparar padrões de persistência com e sem tratamento com maprotilina.
- Estabelecer valores de CIM para maprotilina
- Avaliar o efeito da maprotilina em padrões celulares
- Identificar diferenças em sequências genéticas de plasmídeos que apresentam padrões de persistência distintos.
- Identificar grupos de Incompatibilidade

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Swabs retal e urina foram coletados em pacientes atendidos pelo Instituto Fleury de Medicina e Saúde de São Paulo e Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de agosto de 2013 a fevereiro de 2015. Bactérias apresentando resistência aos carbapenêmicos foram isoladas em ágar MacConkey e estocadas em caldo LB com 20% de glicerol a -70°C.

4.2 Extração de DNA genômico

As extrações de DNA genômico foram realizadas através do método de lise térmica. Bactérias foram inoculadas em ágar LB e após 18 a 24 horas de incubação a 36°C ± 1°C, três a quatro colônias isoladas foram inoculadas em 200 µL água ultrapura e fervidas por 10 minutos. Em seguida, foram submetidas a congelamento a -20°C por 10 minutos. Para amplificação do DNA, as extrações foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas e centrifugadas a 16.000xg por 2 min. O sobrenadante foi coletado e mantido a -80°C.

4.3. Identificação de espécies bacterianas

A identificação das espécies foi realizada através do espectrômetro de massa Vitek-MS (bioMérieux) e sequenciamento do gene *gyrB* (BRADY et al., 2013). Para identificação de subespécies foi realizado o sequenciamento parcial do gene *hsp60* (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003). O método do BigDye Terminator versão 3.1 e 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) foi realizado de acordo com recomendações do fabricante. Os contigs foram montados usando o programa DNABaser versão 3.4.5 (Heracle Biosoft) e comparado, utilizando-se o programa BLAST, com sequências disponíveis no GenBank.

4.4 Detecção do gene *bla*_{NDM-1}

A PCR multiplex para detecção de genes de carbapenemases *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM}, foi realizada segundo a descrição original (POIREL; WALSH; et al., 2011), exceto quanto ao uso da Taq Platinum (Thermo) e inclusão dos primers 5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG e 3'GGTTACCTTGTTACGACTT (MAIWALD, 2004) para detecção do gene 16S rRNA como controle interno.

Para a detecção das variantes do gene *bla*_{NDM}, amostras positivas no PCR multiplex para *bla*_{NDM} tiveram o gene totalmente sequenciado utilizando-se os primers NDM-L-bleo-FW-5'TGGGTCGAGGTCAGGATAGG e NDM-R-Aba-125-3'GCTTTGAAACTGTGCGACCT (CAMPOS et al., 2015). Os amplicons foram purificados com Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life

Sciences) e sequenciados utilizando-se o kit do BigDye Terminator versão 3.1 e 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acordo com recomendações do fabricante. Os contigs foram montados utilizando-se o programa DNABaser versão 3.4.5 (Heracle Biosoft) e comparado, através do BLAST software, com sequências disponíveis no GenBank.

4.5 Preparo de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 foram preparadas inoculando-se 2,5 mL de uma cultura overnight da cepa em 250 mL de caldo LB. 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 $4000 \times g$ por 15 min a 4°C .

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 45 mL de água gelada contendo 10% glicerol. Uma nova centrifugação foi realizada e 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. Por fim, 1 mL de água gelada com glicerol foi adicionada em cada tubo para concentrar a solução bacteriana e os tubos foram centrifugados.

O pellet final 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 (BIO-RAD).

4.6 Extração de DNA plasmidial

Os isolados foram cultivados em ágar LB 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 e incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ overnight.

Para a extração do DNA plasmidial o método de lise alcalina descrito por Birnboim & Doly (BIRNBOIM; DOLY, 1979) com modificações descritas por Sambrook e Russell (SAMBROOK, 2001), foi realizado. Uma alíquota de 1,5 mL de cultura foi submetida à centrifugação a $16.000 \times g$ por 30 seg. a 4°C , o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspenso em 100 μL de solução I (20mg/mL lisozima, 50mM glicose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl – pH 8,0). Em seguida, adicionou-se 200 μL de solução II (0,2N NaOH, 1% SDS) o tubo foi homogeneizado por inversão.

Após exatos 5 min de incubação no gelo, 150 μL de solução III gelada (3M 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 $16000 \times g$ por 5 min a 4°C e 250 μL do sobrenadante foi transferido 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 $16000 \times g$ por 2 min a 4°C . Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 100 μL de solução IV gelada (0,1M acetato de sódio/ 0,05M Tris-HCl - pH 8,0) e o

DNA precipitado com 200 μ L de etanol absoluto gelado. O tubo foi incubado a -20°C por 10 min e centrifugado novamente. O sedimento foi ressuspenso em 30 μ L de TE buffer. A concentração de DNA plasmidial foi quantificada utilizando-se um Nanodrop® e as extrações foram armazenadas a -80°C .

4.7 Transformação em *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação

Foram adicionados 3 μ L do DNA plasmidial em 50 μ L da alíquota da célula eletrocompetente (BIO-RAD). Homogeneizou-se cuidadosamente a suspensão e incubou-se em gelo por aproximadamente 1 min. Foram transferidos 40 μ L 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 1,5mL que foi incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 h a 100 rpm. Foram inoculados 50 μ L em três placas de ágar LB contendo 4 mg/L de ceftazidima. A presença do gene *bla*_{NDM} nos transformantes foi confirmada por PCR.

4.8 Perfil plasmidial dos isolados bacterianos

O tamanho dos plasmídeos foi estimado através da 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 et al., 1978).

4.9 Sequenciamento de plasmídeos

A plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina) foi utilizada para o sequenciamento dos plasmídeos que foram extraídos dos transformantes (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001).

O preparo da biblioteca foi realizado com o kit Nextera XT DNA Sample Preparation (Illumina) conforme as recomendações do fabricante, com modificações no input de DNA inicial 10X superior à recomendada (2 ng/μL). O sistema comercial MiSeq Reagent v2 – 500 cycles (Illumina) foi utilizado segundo as especificações do fabricante na etapa de sequenciamento.

4.10 Análise do sequenciamento

Os plasmídeos foram montados utilizando-se os programas SeqMan NGen (DNASTar) ou Geneious (Biomatters Limited) e a seguir submetidos a anotação automática utilizando-se o programa RAST, seguido de curadoria manual utilizando-se o programa Artemis (Sanger Institute).

Eventuais discrepâncias foram resolvidas desenhando-se iniciadores com base nas sequências conhecidas e realizando-se reações de PCR. Os amplicons foram sequenciados utilizando-se o kit BigDye Terminator versão 3.1 no sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.11 Determinação de grupos de incompatibilidade

Os contigs dos plasmídeos obtidos por meio do sequenciamento foram submetidos ao banco de dados PlasmidFinder-1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) para determinação dos grupos de incompatibilidade. Essa ferramenta é baseada em dados de replicons de plasmídeos já curados e depositados no GenBank e aceita dados gerados a partir de sequenciamento total de plasmídeo e genoma em forma de contigs, sequências de Sanger alinhadas ou até mesmo sequências sem qualquer curadoria. O PlasmidFinder determina qual o tipo de replicon e grupo de incompatibilidade, bem como um plasmídeo de referência para cada linhagem (CARATTOLI et al., 2014).

4.12 Ensaios de persistência plasmidial

Para definir padrões de persistência plasmidial, o método de contagem em placa foi seguido (SOTA et al., 2010). Amostras bacterianas selvagens foram inoculadas em 5 mL de caldo LB com ceftazidima (4mg/L) e incubadas a 37°C em agitação (100 rpm), gerando uma população homogênea de bactérias albergando plasmídeos (T0). Por 10 dias, 4.88 µL do caldo bacteriano foi inoculado em um novo tubo contendo 5 mL de caldo LB sem ceftazidima, no mesmo intervalo de tempo. Para avaliar o efeito de cura plasmidial da maprotilina (Sigma), o mesmo protocolo foi seguido, exceto que concentrações sub-inibitórias (50 mg/L) do fármaco foram adicionadas em caldo LB a partir do T1.

De cada ponto (T0, T1, T2...T10), uma alíquota foi retirada e uma diluição em série foi realizada para que pelo menos 52 colônias fossem isoladas em LB ágar, após a incubação a 37°C por 12-18h. As 52 colônias foram semeadas em ágar LB e ágar LB com 4mg/L de ceftazidima, respectivamente, com o auxílio de palitos estéreis. A razão entre colônias que cresceram em LB ágar com ceftazidima com as que cresceram em LB ágar, foi utilizado para montar a curva de persistência plasmidial.

O experimento foi feito em triplicata para cada isolado bacteriano. Uma colônia de cada triplicata do T10, que apresentou perda plasmidial, foi isolada e estocada em ágar LB para verificação da perda plasmidial. Caso não tenha ocorrida perda plasmidial, uma colônia de cada triplicata do T10 também foi estocada para confirmação quanto a presença do plasmídeo albergando *bla*_{NDM-1}.

Teste fenotípico Blue-Carba (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013) foi realizado em colônias isoladas do T10 do ensaio de estabilidade, para avaliar a atividade de hidrólise do Imipenem pela enzima NDM-1. Adicionalmente, PCR para o gene *bla*_{NDM} (POIREL; WALSH; et al., 2011), extração de plasmídeo (BIRNBOIM; DOLY, 1979) e gel de eletroforese (gel a 0.7%, 5h, 100V e 400mA) foram realizados para verificar perda plasmidial. Se negativo para essas três condições, a perda plasmidial foi considerada verdadeira. Para averiguar contaminação, todas as colônias do T10 foram novamente submetidas à identificação pelo sistema Vitek-MS (bioMérieux).

4.13 Análise de dados dos ensaios de persistência plasmidial

Para a comparação das duas curvas de persistência plasmidial (com e sem maprotilina), o critério de informação Bayesina (BIC) foi utilizado. Esse princípio permite a comparação de mais de dois modelos simultaneamente, trazendo vantagens por reduzir o erro tipo I. Os valores de BIC ponderam as evidências nos dados em favor ou contra um conjunto de modelos. Nesta análise, são comparados os valores de BIC (1) de um modelo que leva em consideração dois conjuntos de fração de segregação (λ) e custo plasmidial (σ), que são necessários para explicar as duas curvas de persistência (“BICsep” para dinâmicas separadas, com (2) um modelo que agrega apenas um conjunto de parâmetros de λ e σ (“BICjoint” se a dinâmica for única). Os modelos são baseados em equações matemáticas que explicam que de uma geração para outra, o número de células com plasmídeos é duas vezes maior do que a geração anterior menos a fração de perda plasmidial (λ), causada por erros de segregação. Células livres de plasmídeos se multiplicam em uma taxa de $2^{1+\sigma}$, na qual σ representa vantagem evolutiva devido ao custo metabólico plasmidial (DE GELDER et al., 2004; LOFTIE-EATON et al., 2015; PONCIANO et al., 2007).

Os valores de comparação são expressos em ΔBIC que mostram a magnitude da diferença entre as duas curvas. Uma dinâmica de curva única (“BICjoint”) é caracterizada por valores únicos de λ e σ , enquanto que “BICsep” o valor de BIC assume que as curvas possuem dinâmicas distintas e dois conjuntos de λ e σ . A diferença entre “BICsep” e “BICjoint” é o valor de ΔBIC . Valores mais negativos indicam uma maior diferença entre as dinâmicas das curvas (LOFTIE-EATON et al., 2015; TAPER, 2016).

4.14 Teste de Susceptibilidade a Maprotilina

Concentração Inibitória Mínima (CIM) da maprotilina (Sigma) foi determinada pelo método de microdiluição, com modificações (CLSI, 2012). O ensaio foi feito em triplicata para cada isolado bacteriano e o caldo LB foi utilizado como meio de cultura, pois foi o meio utilizado no ensaio de persistência plasmidial.

4.15 Avaliação do efeito da maprotilina no crescimento celular

Para avaliar o efeito da maprotilina em células bacterianas, curvas de crescimento foram estabelecidas. Placas de 96 poços, construídas pelo método de susceptibilidade, foram incubadas no leitor de microplacas PowerWave HT Microplate Spectrophotometer (BioTek) a 37°C por 24h com agitação de 100 rpm, para análise do efeito do fármaco na capacidade de carga (λ), taxa de crescimento, representada pela inclinação máxima da curva (μ) e crescimento máximo celular (a).

As leituras para a construção da curva foram estabelecidas a cada 10 min a uma absorbância de OD600nm. Os dados foram obtidos através do PowerWave Scanning Spectrophotometer model RPRWI software e analisados pelo programa R (RStudio Version 0.98.1102). A correção de Bonferroni foi utilizada e valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. (MATTHIAS KAHM, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 Isolados bacterianos

Um total de nove isolados bacterianos foram incluídos neste trabalho. Duas espécies de *Escherichia coli* (E0083033-2 e E8162888-2), um *Citrobacter freundii* (E2143152), quatro *Enterobacter* spp. (E0083033-1, E214365, E6192100, E8162888-1), provindos do Rio de Janeiro, uma *Klebsiella pneumoniae* (F5280088) da Bahia e uma *Providência rettgeri* (HCPA1) do Rio Grande do Sul. Todos os isolados foram identificados por Vitek-MS (bioMérieux) com 99% de confiança (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados bacterianos investigados neste trabalho

Amostra	Nº isolado	Espécie bacteriana	Local
NDM 2	E0083033-2	<i>Escherichia coli</i>	Cabo-Frio-RJ
NDM 19	E8162888-2	<i>Escherichia coli</i>	Rio de Janeiro-RJ
NDM 3	E2143152	<i>Citrobacter freundii</i>	Rio de Janeiro-RJ
NDM 1	E0083033-1	<i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>steigerwaltii</i> ”	Cabo Frio-RJ
NDM 4	E2143165	<i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>oharae</i> ”	Rio de Janeiro-RJ
NDM 15	E6192100	<i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>oharae</i> ”	Rio de Janeiro-RJ
NDM 18	E8162888-1	<i>Enterobacter hormaechei</i> “subsp. <i>oharae</i> ”	Rio de Janeiro-RJ
NDM 21	F5280088	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Salvador-BA
HCPA1	HCPA-1	<i>Providencia rettgeri</i>	Porto Alegre-RS

Para a identificação de espécies de *Enterobacter* spp., sequências parciais do gene *gyrB* (1.171 pb) foram comparadas com as cepas de referência publicadas por Brady *et al.* (BRADY *et al.*, 2013) e apresentaram alta similaridade (>90%) com a espécie bacteriana *Enterobacter hormaechei*. As sequências parciais do gene *hsp60* (341 pb),

para identificação a nível de sub-espécie, revelaram que o isolado E0083033-2 (NDM 1) pertence a “subespécie” *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, e os outros três isolados (NDM 4, NDM 15 e NDM 18) à “subespécie” *E. hormaechei* “subsp. *oharae*”.

5.2 Amostras albergam o gene *bla*_{NDM-1}

O gene *bla*_{NDM} foi confirmado em todas as espécies por multiplex PCR e o sequenciamento dos amplicons mostrou que a variante *bla*_{NDM-1} é o gene presente em todos os isolados bacterianos.

5.3. Plasmídeos carregam o gene *bla*_{NDM-1}

Plasmídeos foram isolados de todos as espécies e eletroporados em *E. coli* TOP10. Os transformantes foram obtidos de todas as espécies e mostraram-se positivos para *bla*_{NDM} pela técnica de PCR, indicando, desta forma, que o gene está presente em plasmídeo e não em cromossomo.

Géis de eletroforese revelaram os tamanhos dos plasmídeos com *bla*_{NDM-1} que variam entre os isolados: *Enterobacter* spp. ≈100Kb (NDM1, NDM4, NDM15, NDM18), *Citrobacter freundii* ≈100Kb (NDM3), *E. coli* (NDM2) ≈80Kb, *E. coli* (NDM19) ≈100Kb, *K. pneumoniae* ≈200Kb (NDM21) e *P. rettgerii* ≈105Kb (HCPA-1) (Figura 8).

Figura 8. Gel de agarose 0.7% de plasmídeo, submetido a eletroforese. Os transformantes (TF) *E. coli* TOP 10 dos isolados selvagens apresentaram um único plasmídeo albergado o gene *bla*_{NDM-1}. Os transformantes de *E. hormaechei* spp. (NDM1, NDM4, NDM15 e NDM18) apresentam plasmídeos de ≈100 Kb. Os transformantes de *E. coli* (NDM2) apresenta um plasmídeo de ≈80 Kb e *E. coli* (NDM19) e *C. freundii* de ≈100 Kb. O transformante de *P. rettgeri* (HCPA-1) apresenta plasmídeo de ≈105 Kb, enquanto que o de *K. pneumoniae* (NDM21) apresenta um plasmídeo de ≈200 Kb.

Além dos plasmídeos com *bla*_{NDM-1}, os isolados selvagens carregam muitos outros plasmídeos. *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” (NDM1) possui 5 plasmídeos de tamanhos entre ≈220 Kb; ≈100 Kb; ≈70 Kb; ≈7 Kb e ≈6 Kb. *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM4, NDM15 e NDM18) possuem 7 plasmídeos um de ≈100 Kb e seis menores que 7 Kb. A *E. coli* selvagem (NDM 2) possui apenas dois plasmídeos um de ≈180Kb e ≈80Kb enquanto que a *E. coli* (NDM 19) apresenta 6 plasmídeos distintos, sendo seis menores que 7Kb e um de ≈100Kb. *C. freundii* (NDM3) apresenta 3 plasmídeos sendo um de ≈100 Kb e dois menores que 7 Kb. O isolado de *K. pneumoniae* (NDM21) apresenta dois

plasmídeos sendo um de ≈ 200 Kb e outro de ≈ 150 Kb. Na cepa selvagem de *P. rettgeri* não foi possível detectar o plasmídeo de ≈ 105 Kb confirmado em seu transformante, devido à dificuldade de extração de plasmídeos nesta espécie. Mesmo assim, o gel de eletroforese evidenciou dois plasmídeos menores que 7 Kb na cepa selvagem deste isolado (Figura 9).

Figura 9. Gel de agarose 0.7% de plasmídeo, submetido a eletroforese. As cepas selvagens dos isolados deste estudo apresentam mais plasmídeos além do plasmídeo albergado o gene *bla*_{NDM-1}. *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” (NDM1) possui 5 plasmídeos de tamanhos entre ≈ 220 Kb; ≈ 100 Kb; ≈ 70 Kb; ≈ 7 Kb e ≈ 6 Kb. *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM4, NDM15 e NDM18) possuem 7 plasmídeos um de ≈ 100 Kb e seis menores que 7 Kb. A *E. coli* (NDM 2) possui apenas dois plasmídeos um de ≈ 180 Kb e ≈ 80 Kb enquanto que a *E. coli* (NDM 19) apresenta 6 plasmídeos distintos, sendo seis menores que 7 Kb e um de ≈ 100 Kb. *C. freundii* (NDM3) apresenta 3 plasmídeos, um de ≈ 100 Kb e dois menores que 7 Kb. O isolado de *K. pneumoniae* (NDM21) apresenta dois plasmídeos um de ≈ 200 Kb e outro de ≈ 150 Kb. Em *P. rettgeri* devido à dificuldade da extração plasmidial, evidenciou-se apenas dois plasmídeos menores que 7 Kb e o plasmídeo de ≈ 105 Kb albergando o gene *bla*_{NDM-1}, detectado em seu transformante, não foi isolado.

5.4 A maprotilina não afeta parâmetros do crescimento bacteriano

A maprotilina apresentou concentrações inibitórias mínimas de 64 mg/L para isolados de *Enterobacter* spp., *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae* e de 256 mg/L para *P. rettgeri*, em caldo LB. A concentração sub-inibitória de 50mg/L de maprotilina foi estabelecido para avaliar a atividade de cura plasmidial do fármaco.

O fármaco não teve efeito sobre o crescimento bacteriano em concentrações sub-inibitórias (Figura 10), pois não afetou significativamente a capacidade de carga (λ), taxa de crescimento (μ) e crescimento máximo celular (a), $p > 0.4$, $p > 0.4$ e $p > 0.6$ respectivamente.

Desta forma, a maprotilina não tem efeito na persistência plasmidial por influência na diminuição do crescimento celular, o que poderia diminuir o número de células-filhas por geração e causar uma falsa estabilidade plasmidial, se o mesmo for perdido principalmente por falha em mecanismos segregacionais.

Capacidade de carga (λ)

Crescimento máximo celular (a)

Taxa de crescimento (μ)

Figura 10. Análise do efeito da maprotilina na capacidade de carga celular, crescimento máximo celular e taxa de crescimento, em *Enterobacteriaceae*. Maprotilina não teve efeito significativo em padrões de crescimento celular ($p > 0.05$). C- Tratamento controle sem o fármaco; M- Tratamento com 50 mg/L de maprotilina. Ensaio realizado em caldo LB.

5.5 Persistência plasmidial

Os plasmídeos de todos os isolados selvagens tiveram alta persistência após 100 gerações na ausência de pressão seletiva. No grupo dos *Enterobacter* spp. não houve perda plasmidial, enquanto que *P. rettgeri* mostrou a maior taxa de perda plasmidial (45%). O isolado *C. freundii* teve 26% de perda enquanto que *E. coli* e *K. pneumoniae* tiveram perda plasmidial entre 6% e 12% (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Método de contagem em placa, ensaio sem maprotilina. Um total de 52 colônias foram repicadas em ágar LB e ágar LB com 4 mg/L de ceftazidima (CAZ). *P. rettgeri* foi o isolado que apresentou maior perda de plasmídeos após 100 gerações (T10), enquanto que *E. hormaechei* "subsp. steigerwaltii" foi uma das espécies que não apresentou perda plasmidial.

Na presença de concentrações sub-inibitórias da maprotilina (50 mg/L), a taxa de perda plasmidial foi significativamente maior em *E. hormaechei* "subsp. stwigerwaltii" ($\Delta\text{BIC} = -57.26$), *E. coli* (NDM2) ($\Delta\text{BIC} = -100.64$), *E. coli* (NDM19) ($\Delta\text{BIC} = -143.66$), *K. pneumoniae* ($\Delta\text{BIC} = -150.12$) e *P. rettgeri* ($\Delta\text{BIC} = -1269.07$). As espécies de *E. hormaechei* "subsp. oharae" não apresentaram perda de plasmídeo enquanto que *C. freundii* teve perda de 29%, porém não significativa ($\Delta\text{BIC} = 6.20$) (Figura 12).

Figura 12. Ensaio de persistência plasmidial. Controle está representado pela linha pontilhada com bolas abertas e o tratamento com maprotilina (50 mg/L), está representado pela linha tracejada com cruces. Plasmídeos albergando gene *bla*_{NDM-1} mostraram-se estáveis após 100 gerações (10 dias) em ambiente sem seleção. *P. rettgeri* apresentou maior taxa de perda plasmidial (45%). Maprotilina teve atividade de cura plasmidial em *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *E. hormaechei* "subsp. *stwierwaltii*", mas não em *C. freundii* e *E. hormaechei* "subsp. *oharae*".

O tratamento com maprotilina foi de alta eficiência em *P. rettgeri* na qual, em 100 gerações, apresentou 100% de perda plasmidial detectável pelo método de contagem em placa. Em *E. coli*, a cura plasmidial ocorreu a uma taxa de 40-47%, enquanto que *K. pneumoniae* e *Enterobacter hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” tiveram cura de 45% e 25%, respectivamente (Figura 12).

Todos as colônias isoladas em T10, que apresentaram perda plasmidial, foram negativas na PCR para o gene *bla*_{NDM}, apresentaram hidrólise negativa pelo teste Blue-Carba, e plasmídeos não foram isolados em gel de eletroforese. A presença de plasmídeo em espécies *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” foram confirmadas pelos mesmos métodos, e foram positivos para os três (Figura13).

Figura 9. Gel de plasmídeo após ensaio de persistência plasmidial com maprotilina. A cura plasmidial foi comprovada por gel de eletroforese 0.7 %. Os isolados de *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM4, NDM15, NDM18) não apresentaram perda plasmidial. Os isolados de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” (NDM1), *E. coli* (NDM2 e NDM19), *C. freundii* (NDM3) *K. pneumoniae* (NDM21) e *P. rettgeri* (HCPA-1) apresentaram perda plasmidial.

As espécies, de todas as colônias isoladas em T10, foram reconfirmadas por Vitek-MS (bioMérieux) e todas foram identificadas com 99% de confiança, indicando que os ensaios não sofreram contaminação.

5.6 O plasmídeo de menor persistência possui uma sequência de inserção a mais do que plasmídeos de alta persistência

Todos os plasmídeos dos isolados transformantes foram totalmente sequenciados. O plasmídeo que apresentou menor persistência, pPr249F, em isolado de *P. rettgeri*, possui 99% de similaridade com o plasmídeo pEh1A (nº de acesso no GenBank KR822246) (CAMPOS et al., 2015), isolado de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” (NDM1), e com o plasmídeo pEh18A isolado *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM18).

Enquanto pPr249F teve menor persistência plasmidial, pEh1A e pEh18A apresentaram alta persistência plasmidial, após 100 gerações, na ausência de seleção, comportamentos totalmente discrepantes. Alinhando-se as sequências dos plasmídeos, evidenciou-se a presença de 24 pares de bases em pPr249F entre as posições 2.876 pb a 2.900 pb e 40 pb em pEh18A entre 2.876 pb a 2.915 pb, que não estão presentes em pEh1A. Uma outra sequência de 1.198 pb, entre as posições 82.022 pb e 83.220 pb, está presente em pPr249F e ausente em pEh1A e pEh18A (Figura 14).

As sequências de 24 pb e de 1.198 pb foram alinhadas a sequências depositadas no banco de dados do GenBank, através do site BLAST. A sequência de 24 pb não apresentou alta similaridade com nenhuma sequência disponível no banco de dados,

enquanto que a sequência de 1.198 pb mostrou alta similaridade (99%) a uma transposase de *Enterobacter asburiae* (nº de acesso no GenBank CP011591). Essa sequência foi então submetida a base de dados do IS Finder para classificação da transposase e uma similaridade de 96% a IS5 de *E. coli* foi detectada.

Com base na anotação da sequência do plasmídeo pEh1A (nº de acesso no GenBank KR822246) (CAMPOS et al., 2015), verificou-se que a sequência de 24 pb está inserida entre uma proteína hipotética pEh1A_0002 e um DNA não codificante, enquanto que a IS5 encontra-se inserida no início de uma proteína hipotética pEh1A_0077 (Figuras 15A e 15B)

Figura 14. Alinhamento das sequências dos plasmídeos pEh1A de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, pPr249F de *P. rettgeri* e pEh18A de *E. hormaechei* “subsp. *oharae*”. O plasmídeo pPr249F e pEh18A possuem 24 pb e 40 pb, respectivamente, entre as regiões 2.876 pb e 2.915 pb, que estão ausentes (linha tracejada) em pEh1A (Figura acima). Uma IS5 de 1.198 pb entre as posições 82.022 pb e 83.220 pb está presente em pPr249F e ausente (linha tracejada) em pEh1A e pEh18A (Figura abaixo).

Figura 15. Anotação do plasmídeo pEh1A de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”. A- Local onde as 24 pb do plasmídeo pPr249F está localizada em relação ao pEh1A. A sequência se encontra (seta) entre uma proteína hipotética pEh1A_0002 e uma DNA não codificante em amarelo. B- Local de inserção da IS5. A sequência de 1198 pb insere-se no início da proteína hipotética pEh1A_0077 (seta).

5.7 Grupos de Incompatibilidade

Os plasmídeos de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” e *E. coli* (NDM2) foram sequenciados e avaliados quanto a grupos de incompatibilidade em trabalho recentemente publicado por nosso grupo e colaboradores (CAMPOS et al., 2015).

O plasmídeo em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, nomeado de pEh1A, faz parte do grupo de incompatibilidade IncFII_k devido à alta similaridade (99%) dos genes *oriV* e *repA* com o plasmídeo pKF3-94 (GenBank accession no. FJ876826.1), pertencente a este grupo (ZHAO et al., 2010). Em *P. rettgeri*, e *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM18) os plasmídeos possuem a mesma sequência gênica do plasmídeo pEh1A, diferindo por apenas 24 pb (Figura 12) em *P. rettgeri* e uma inserção de 80pb em *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM18). Desta forma, esses plasmídeos também fazem parte da família dos IncFII_k.

O plasmídeo de *E. coli* (NDM2), nomeado de pEc2A (CAMPOS et al., 2015), faz parte do grupo de incompatibilidade IncX por possuir genes (*pir*, *bis*, *parA*, *hns*, and *topB*) tipicamente encontrados nesta família (CHEN, L. et al., 2013). Análises comparativas mostraram que o plasmídeo apresenta alta similaridade (>95%) com os plasmídeos pEC14_35 (nº de acesso no GenBank JN935899) (JOHNSON, T. J. et al., 2012) e plncX-SHV (nº de acesso no GenBank JN247852) (GARCIA-FERNANDEZ et al., 2012), ambos representantes da família IncX3.

Para os plasmídeos nas quais não foi finalizada a montagem, as sequências dos contigs foram submetidas ao site Plasmid Finder-1.3. (CARATTOLI et al., 2014), para caracterização de grupos de incompatibilidade.

Plasmídeos das espécies de *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM4, NDM15) e *E. coli* (NDM19) tiveram 100% de similaridade com sequências de replicons do plasmídeo pKPX-1 de *K. pneumoniae* (nº de acesso no GenBank AP012055.1) (HUANG et al., 2013), na qual pertence ao grupo de incompatibilidade IncFII.

Em *K. pneumoniae*, o plasmídeo teve alta similaridade com dois grupos distintos: um ao grupo de incompatibilidade IncFIB e outro ao IncHI1B do plasmídeo pNDM-MAR (nº de acesso no GenBank JN420336) (VILLA et al., 2012), com 100% e 99.47% de similaridade, respectivamente.

O plasmídeo isolado de *C. freundii* apresentou 98.95% de similaridade com grupo de incompatibilidade IncY baseado em sequências de um fago P1, encontrado em Enterobactérias (nº de acesso no GenBank K02380) (ABELES; SNYDER; CHATTORAJ, 1984).

6. DISCUSSÃO

Membros da família *Enterobacteriaceae* são frequentemente associados a disseminação da resistência a β -lactâmicos, em ambientes nosocomiais (CUZON et al., 2010; RUBIN et al., 2014; ZUJIC ATALIC et al., 2014a). Todos os isolados deste trabalho pertencem a essa família e apresentam resistência aos carbapenêmicos em função da expressão da carbapenemase

Entre as espécies de *Enterobacter hormaechei* spp., foram identificadas duas “subespécies” distintas que carregam o gene *bla*_{NDM1}, sendo elas *Enterobacter hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” e *Enterobacter hormaechei* “subsp. *oharae*”. Essa subcategoria não está oficialmente estabelecida (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003), porém existe uma extrema importância quanto à distinção de microrganismos que carregam diferentes plasmídeos com genes de resistência.

Diferentes gêneros de bactérias, disseminadoras da resistência do tipo NDM-1 já foram reportadas em diferentes regiões no mundo (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Neste trabalho, cepas foram isoladas em diferentes regiões do Brasil entre elas Rio Grande do Sul, Salvador e Rio de Janeiro, mostrando uma rápida dispersão também no Brasil. Entre os nove isolados, sete pertencem ao estado do Rio de Janeiro.

Todos os isolados codificam o gene *bla*_{NDM-1} em plasmídeos de famílias e tamanhos distintos. Isso corrobora com estudos que mostram que diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* também carregam esse gene em plasmídeo (CAMPOS et al., 2015; CARATTOLI, 2013; CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Diferentemente, membros do grupo dos não-fermentadores como *Acinetobacter* spp., codificam o gene

*bla*_{NDM-1} principalmente em seu próprio cromossomo (CHEN, Y. et al., 2011; DORTET et al., 2014; JOHNSON, A. P.; WOODFORD, 2013; NORDMANN et al., 2011).

A maioria dos plasmídeos isolados fazem parte do grupo de incompatibilidade IncF sendo IncFII, IncFII_k e IncFI os três variantes isoladas neste trabalho. Essa família de plasmídeos possui uma grande importância em relação a disseminação de resistência aos antimicrobianos. Em *Enterobacteriaceae*, este grupo está relacionado a disseminação de ESBL's do tipo CTX-M-8, CTX-M-14 e CTX-M-15 na China, Brasil e Turquia (DROPA et al., 2016; GONULLU et al., 2008; HO; YEUNG; et al., 2012). Outras β -lactamases do tipo TEM-1 e OXA-1 também foram relatadas neste grupo (TORRES et al., 2015).

Existe uma grande preocupação quanto a disseminação de resistência do tipo NDM-1 por grupos de IncF, por possuírem uma alta eficiência no sistema de transferência plasmidial. Essa eficiência se deve ao sistema conjugativo regulado pelo operon *tra*, na qual codifica proteínas e reguladores de transferência de DNA altamente sofisticados. Uma alta taxa conjugativa, na qual novos transconjugantes se pareiam com alta frequência, garantindo que todas as células receptoras herdem o plasmídeo. Essa família de plasmídeo também é conhecida como “disseminadores de epidemias” devido a sua grande importância na disseminação de resistência aos antimicrobianos (GUBBINS; WILL; FROST, 2005).

Em *E. coli* (NDM2), o plasmídeo que codifica NDM-1 faz parte do grupo IncX3. Este grupo está associado à disseminação de diversas carbapenemases como *bla*_{KPC-3} em *K. pneumoniae* (FORTINI et al., 2015), *bla*_{NDM} em Enterobactérias na Austrália (WAILAN et al., 2015) e *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} em *C. freundii* na China (FENG et al., 2015).

Esse grupo está fortemente associado à dispersão dos genes *bla_{NDM}* pelo mundo, pois existem vários relatos de diferentes variantes do gene envolvendo este grupo (GOTTIG et al., 2013; SONNEVEND et al., 2013; YANG, P. et al., 2014). Os IncX3 são conhecidos por possuírem uma pequena gama de hospedeiros em *Enterobacteriaceae* (HO; LI; et al., 2012), entretanto, novas pesquisas deveriam investigar a habilidade de transmissão de plasmídeos deste grupo devido à alta disseminação de genes de carbapenemases em diferentes espécies e regiões do mundo.

Outro grupo plasmidial albergando o gene *bla_{NDM-1}* foi o grupo IncHI1B, isolado de *K. pneumoniae*. Mesmo este grupo estando mais fortemente relacionado com cepas ambientais (DOLEJSKA et al., 2013; WALSH et al., 2012), existe uma grande importância na disseminação de NDM na qual foi também relatado em cepa de *C. freundii* que carregava não só o gene *bla_{NDM}* como também sistemas TA, na qual auxiliam na persistência plasmidial neste grupo (DOLEJSKA et al., 2013).

Por fim o grupo IncY foi relacionado ao plasmídeo isolado em *C. freundii*. Resistência a *bla_{ESBL}*, CTX-M-1 e CTX-M-15 já foram associados a este grupo plasmidial, em isolados de fezes animais e produção alimentar (DAMBORG et al., 2015; WANG et al., 2013). Pouco se sabe sobre mecanismos moleculares de plasmídeos IncY em bactérias, já que o replicon deste grupo é baseado em sequências de um fago P1 e este fago vem sendo relacionado a isolados de Enterobactérias (ABELES et al., 1984)

A persistência dos plasmídeos com *bla_{NDM-1}*, na ausência de seleção, foi alta em todos os isolados, sendo que *P. rettgeri* foi o representante com maior taxa de perda plasmidial. Isso confirma que plasmídeos que conferem genes de resistência estão altamente adaptados a diferentes hospedeiros e possuem sistemas moleculares, que

auxiliam na sua manutenção em uma população bacteriana (BERGSTROM et al., 2000; LOFTIE-EATON et al., 2015; SLATER et al., 2008).

O tratamento com maprotilina teve efeito de cura plasmidial em todos os isolados exceto em isolados de *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii*. O isolado de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” apresentou apenas 25% de cura plasmidial enquanto que *P. rettgeri* foi o que apresentou maior perda plasmidial chegando a 100% de cura, mensurável pelo método de contagem em placa. Isso sugere que os plasmídeos em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii* possuem sistemas de manutenção plasmidial (LOFTIE-EATON et al., 2015; SLATER et al., 2008) capazes de superar a perda do plasmídeo causada pela diminuição da replicação plasmidial por agentes intercalantes (LETCHUMANAN et al., 2015) e que esses sistemas podem estar ausentes em *P. rettgeri* e nas outras espécies que apresentaram alta taxa de cura plasmidial.

Outra possibilidade pode estar na divergência do empacotamento de DNA plasmidial dentro da célula hospedeira. Agentes intercalantes de DNA, tal como a maprotilina, possuem preferência de ligação com plasmídeos super-enovelados (SPENGLER et al., 2006), dessa forma, *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii* poderiam apresentar formas plasmidiais mais relaxadas, diminuindo a ligação do fármaco com o plasmídeo e permitindo a replicação e segregação do plasmídeo para as células-filhas.

Mesmo essa hipótese sendo uma possibilidade, essa alternativa geraria um alto custo metabólico para células bacterianas, já que plasmídeos em formas relaxadas estão sujeitos a ação de topoisomerasas do tipo II, que requerem a hidrólise de moléculas de

ATP no processo de reparo e replicação plasmidial, enquanto que plasmídeos super-enovelados sofrem a ação de topoisomerase do tipo I, que não exigem gasto de energia (WITZ; STASIAK, 2010). Portanto, a falha na alta diminuição da persistência plasmidial pela maprotilina em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii* tem maiores chances de ter ocorrido por mecanismos de reparo pós-segregacionais tais como sistemas TA e conjugação, do que por mudanças conformacionais do DNA plasmidial.

Essa teoria é comprovada em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” na qual, em publicação recente, evidenciou-se que o plasmídeo pEh1A além de codificar o gene *bla*_{NDM-1} também possui os operons *tra* e *trb*, nas quais são extremamente eficientes no processo de conjugação, e também o operon *ccdAB*, que codifica um sistema toxina-antitoxina (CAMPOS et al., 2015) e, portanto, auxiliam no processo de manutenção plasmidial em uma população bacteriana mesmo quando agentes quelantes dificultam sua replicação.

O mesmo raciocínio se aplica inversamente ao plasmídeo pEc2A de *E. coli* (NDM2), na qual apresentou uma perda de 12% na ausência de seleção e de 40% quando tratado com maprotilina. Sequenciamento do plasmídeo revelou que sistemas TA não estão presentes neste plasmídeo. Entretanto o operon *pilX* está presente mostrando que processos conjugativos podem acontecer (CAMPOS et al., 2015). Dessa forma, a ausência de sistemas pós-segregacionais, como sistema TA, parece estar mais relacionado com a manutenção plasmidial do que sistemas conjugativos.

Curiosamente, essa teoria não se aplica ao plasmídeo pPr249F de menor persistência, isolado em *P. rettgeri*, na qual possui sequência semelhante (99% de

identidade) ao plasmídeo pEh1A de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”. Portanto pPr249F possui os mesmos operons *tra* e *ccdAB*, responsáveis pela manutenção do pEh1A e que não foram suficientes para manter o plasmídeo pPr249F em *P. rettgeri* após 100 gerações na ausência de seleção no tratamento com a maprotilina.

Para entender possíveis mudanças genéticas que poderiam explicar essa baixa persistência de pPr249F, a sequência do plasmídeo pPr249F de *P. rettgeri* foi alinhado com pEh1A de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”. Uma sequência de 24 pb e uma IS5 de 1198 pb está presente em pPr249F e não se encontra em pEh1A. Estudos recentes (HARRISON et al., 2015; LOFTIE-EATON et al., 2015), sobre evolução plasmidial, indicam que adquirir ou perder sequencias gênicas podem ajudar na estabilidade plasmidial, como o caso de evolução de pMS0506 em *P. moraviensis* na qual adquiriu um transpóson de um plasmídeo do mesmo hospedeiro e tornou-se estável em diferentes hospedeiros (LOFTIE-EATON et al., 2015), ou no caso de deleções dos genes *gacA* ou *gacS* em pQBR103, na qual foi suficiente para aumentar a sua persistência em *Pseudomonas fluorescens* (HARRISON et al., 2015). Portanto, a presença dessas sequências em pPr249F e/ou ausência dessas sequências em pEh1A podem estar relacionadas com padrões de persistência distintos encontrados em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” e *P. rettgeri*. Novos estudos de transformação e evolução plasmidial são necessários para comprovar essa teoria.

Para verificar se as sequências divergentes encontradas em pPr249F também estavam ausentes em outros plasmídeos que apresentaram alta persistência, a sequência de pPr249F foi alinhado ao plasmídeo de maior persistência, o pEh18A isolado de *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” (NDM18), na qual não sofreu perda plasmidial

na ausência de seleção e no tratamento com maprotilina. O alinhamento das sequências evidenciou que as 24 pb encontram-se tanto em pPr249F e pEh18A. Entretanto, a IS5, de 1.198 pb, está ausente em pEh18A. Dessa forma a IS5 pode estar mais relacionada com a diminuição da persistência plasmidial em *P. rettgeri* do que a sequência de 24 pb.

Como os plasmídeos pEh1A, pPr249F e pEh18A apresentam 99% de similaridade, foi verificada a possível localização da IS5 e dos 24 pb com base na anotação do plasmídeo pEh1A (nº de acesso no GenBank KR822246) (CAMPOS et al., 2015), para investigar possíveis genes que poderiam ser afetados pela inserção da IS5 e dos 24 pb em *P. rettgeri*.

A sequência de 24 pb encontrada entre as regiões 2.876 pb e 2.889 em pPr249F está localizada na mesma região do pEh18A. Esta sequência se encontra inserida entre uma proteína hipotética *pEh1A_0002* e uma pequena sequência de DNA não codificante, presente em pEh1A. Desta forma, essa inserção não estaria afetando a transcrição de nenhum gene nesses plasmídeos, suportando as evidências de que a IS5 estaria mais relacionada com a perda do pPr249F em *P. rettgeri* do que a sequência de 24 pb.

A inserção da IS5 entre as regiões 82.022 pb e 83.220 em pPr249F mostra que, possivelmente, a sequência estaria inserida no início de uma proteína hipotética *pEh1A_007*, presente em pEh1A, truncando sua transcrição em *P. rettgeri*. Portanto, uma possível explicação para a baixa persistência plasmidial de pPr249F pode estar relacionado com a ausência dessa proteína hipotética. Porém, estudos adicionais para entender a função dessa proteína são necessários para comprovar esta hipótese.

As sequências dos plasmídeos pEh1A e pEh18A diferem apenas por 40 pb, presentes apenas em pEh18A. Essas 40 pb encontram-se na mesma região dos 24 pb

presentes em pPr249F discutidos acima, demonstrando que essa sequência também não afetaria transcrição de genes em pEh18A.

Mesmo não apresentando diferenças gênicas importantes, o plasmídeo pEh1A de *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” apresentou 25% de cura, enquanto que *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” não apresentou cura do plasmídeo pEh18A, durante o tratamento com maprotilina. Uma explicação para esta diferença de persistência, mesmo com sistema TA e operon *tra* presentes em ambos plasmídeos, pode estar relacionada com a melhor adaptação da espécie *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” a plasmídeos da família IncFII_k carregadores do gene *bla*_{NDM-1}.

Estudos de evolução plasmidial comprovam que mutações no cromossomo do hospedeiro podem ocorrer concomitantemente com mutações no plasmídeo, em um processo co-evolutivo, aumentando a persistência do plasmídeo em um hospedeiro específico (LOFTIE-EATON et al., 2015). Portanto, *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” poderia apresentar mutações cromossômicas, que favoreçam a persistência desse plasmídeo, e essas mutações podem estar ausentes em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”. Estudos de sequenciamento genômico são necessários para comprovar essa hipótese. Se confirmada, *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” poderia estar fortemente relacionado com a disseminação de plasmídeos com *bla*_{NDM-1} no Brasil, devido a sua alta adaptação.

7. CONCLUSÕES

- Há uma importância na distinção, a nível de subespécie, em isolados de *E. hormaechei* spp., pois diferentes “subespécies” foram isoladas carregando plasmídeos com *bla*_{NDM-1}, que apresentaram perfis de persistência distintos.
- A maprotilina tem atividade de cura de plasmídeos albergando *bla*_{NDM-1} em *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. rettgeri*, *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*”, porém não tem atividade contra plasmídeos em *E. hormaechei* “subsp. *oharae*” e *C. freundii*.
- Os efeitos de cura plasmidial induzidas pela maprotilina estão fortemente associados à falha na replicação plasmidial, pois o fármaco não tem efeito negativo significativo no crescimento máximo celular, capacidade de carga e taxa de crescimento.
- Os plasmídeos isolados mostraram uma alta persistência plasmidial em ambiente sem seleção, durante 100 gerações, reforçando que plasmídeos, disseminadores de resistência a antimicrobianos, são altamente persistentes em uma população bacteriana.
- A maioria dos plasmídeos pertence ao grupo IncF, que são extremamente eficientes em processos conjugativos e carregam sistemas de manutenção pós-segregacional.
- Outras famílias de plasmídeos também estão relacionadas com a disseminação do gene *bla*_{NDM-1} no Brasil, entre eles os grupos IncX3, IncHI1B e IncY.

- A análise da sequência do plasmídeo pPr249F quando comparada a plasmídeos de alta persistência evidenciou uma IS5 de 1.198 pb presente neste plasmídeo e ausente em plasmídeos de alta persistência.

- A cura plasmidial de 25% em *E. hormaechei* “subsp. *steigerwaltii*” e cura não detectável em *E. hormaechei* “subsp. *oharae*”, após o tratamento com maprotilina, sugere que adaptações no hospedeiro podem estar relacionados com a alta na persistência de plasmídeos albergando o gene *bla*_{NDM-1}, mais do que mudanças genéticas no próprio plasmídeos

REFERÊNCIAS

ABELES, A. L.; SNYDER, K. M.; CHATTORAJ, D. K. P1 plasmid replication: replicon structure. **J Mol Biol**, v. 173, n. 3, p. 307-24, Mar 5 1984.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, n. 1036, p. 321-31, May 16 1980.

ANDERSON, E. S. et al. Clonal distribution of resistance plasmid-carrying *Salmonella typhimurium*, mainly in the Middle East. **J Hyg (Lond)**, v. 79, n. 3, p. 425-48, Dec 1977.

BARANTSEVICH, E. P. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 5, p. 1204-6, May 2013.

BARLOW, M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. **Methods Mol Biol**, v. 532, p. 397-411, 2009.

BARRIOS, H. et al. Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 8, p. 1934-6, Aug 2013.

BERGSTROM, C. T.; LIPSITCH, M.; LEVIN, B. R. Natural selection, infectious transfer

and the existence conditions for bacterial plasmids. **Genetics**, v. 155, n. 4, p. 1505-19, Aug 2000.

BIEDENBACH, D. et al. Dissemination of NDM metallo-beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* collected during the SMART global surveillance study from 2008 to 2012. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 2, p. 826-30, Feb 2015.

BIO-RAD. MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide **BIO-RAD**,

BIRGY, A. et al. 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**, v. 49, n. 8, p. 3085-7, Aug 2011.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 7, n. 6, p. 1513-23, Nov 24 1979.

BOGAERTS, P. et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 3036-8, Jun 2011.

BONNIN, R. A. et al. Dissemination of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing

Acinetobacter baumannii in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 9, p. E362-5, Sep 2012.

BOULANGER, A. et al. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 2214-5, Apr 2012.

BRADY, C. et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. **Syst Appl Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 309-19, Jul 2013.

BUSH, K. New β -Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

_____. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1277, p. 84-90, Jan 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010.

BYRD, D. R.; MATSON, S. W. Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. **Mol Microbiol**, v. 25, n. 6, p. 1011-22, Sep 1997.

CALLEFI, L. A.; MEDEIROS, E. A.; FURTADO, G. H. Impact of the introduction of an automated microbiologic system on the clinical outcomes of bloodstream infections caused by *Enterobacteriaceae* strains. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 1, p. 45-9, Jan-Feb 2013.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7387-95, Dec 2015.

CANTON, R. et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 413-31, May 2012.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, Aug 2013.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **J Microbiol Methods**, v. 63, n. 3, p. 219-28, Dec 2005.

CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p. 3895-903, Jul 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2956-7, Dec 2013.

CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Detection of Enterobacteriaceae isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States, 2010. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 59, n. 24, p. 750, Jun 25 2010.

CHEN, L. et al. 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**, v. 57, n. 1, p. 269-76, Jan 2013.

CHEN, Y. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 6, p. 1255-9, Jun 2011.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. INSTITUTE, C. A. L. S. 2012.

COLINON, C. et al. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 2, p. 258-62, Aug 2007.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 9, p. 1349-56, Sep 2010.

D'ANDREA, M. M. et al. Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 7, p. 2755-8, Jul 2011.

DAMBORG, P. et al. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. **Acta Vet Scand**, v. 57, p. 83, 2015.

DE GELDER, L. et al. Combining mathematical models and statistical methods to understand and predict the dynamics of antibiotic-sensitive mutants in a population of resistant bacteria during experimental evolution. **Genetics**, v. 168, n. 3, p. 1131-44, Nov 2004.

DE GELDER, L. et al. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 2, p. 452-63, Feb 2007.

DE GELDER, L. et al. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. **Appl Environ Microbiol**, v.

71, n. 9, p. 5309-17, Sep 2005.

DE GELDER, L. et al. Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. **Genetics**, v. 178, n. 4, p. 2179-90, Apr 2008.

DE LA CRUZ, F. et al. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 34, n. 1, p. 18-40, Jan 2010.

DEL SOLAR, G. et al. Replication and control of circular bacterial plasmids. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 2, p. 434-64, Jun 1998.

DIONISIO, F. et al. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. **Biol Lett**, v. 1, n. 2, p. 250-2, Jun 22 2005.

DIONISIO, F. et al. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1525-32, Dec 2002.

DOLEJSKA, M. et al. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 34-9, Jan 2013.

DORTET, L.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1693-7, Apr 2012.

DORTET, L. et al. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2359-64, Jul 2014.

DROPA, M. et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in Sao Paulo, Brazil. **Environ Sci Pollut Res Int**, Jan 19 2016.

DZIEWIT, L. et al. The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the tad-ata module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. **J Bacteriol**, v. 189, n. 5, p. 1983-97, Mar 2007.

EGGLESTON, K.; ZHANG, R.; ZECKHAUSER, R. J. The global challenge of antimicrobial resistance: insights from economic analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 7, n. 8, p. 3141-9, Aug 2010.

ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 43-70, 1999.

ESCOBAR PEREZ, J. A. et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 4, p. 1957-60, Apr 2013.

ESPINAL, P. et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 11, p. 5396-8, Nov 2011.

FENG, J. et al. Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDM-HN380-like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 11, p. 2987-91, Nov 2015.

FORTINI, D. et al. Double Copies of blaKPC-3::Tn4401a on an IncX3 Plasmid in *Klebsiella pneumoniae* Successful Clone ST512 from Italy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 1, p. 646-9, 2015.

FU, Y. et al. Epidemiological characteristics and genetic structure of bla_{NDM-1} in non-baumannii *Acinetobacter* spp. in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 9, p. 2114-22, Sep 2012.

FURSTE, J. P. et al. Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 6, p. 1771-5, Mar 1989.

GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 2143-5, Apr 2012.

GARCILLAN-BARCIA, M. P.; FRANCA, M. V.; DE LA CRUZ, F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. **FEMS Microbiol Rev**, v. 33, n. 3, p. 657-87, May 2009.

GEFEN-HALEVI, S. et al. Isolation of genetically unrelated *bla*(NDM-1)-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 1642-3, May 2013.

GELLERT, M. et al. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 11, p. 3872-6, Nov 1976.

GERDES, K. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. **J Bacteriol**, v. 182, n. 3, p. 561-72, Feb 2000.

GERDES, K. et al. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli* *relB* operon. **EMBO J**, v. 5, n. 8, p. 2023-9, Aug 1986.

GHAROUT-SAIT, A. et al. *Enterobacteriaceae* isolates carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase gene in Yemen. **J Med Microbiol**, v. 63, n. Pt 10, p. 1316-23, Oct 2014.

GIAKKOUPI, P. et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 4, p. 382-4, Dec 2013.

GILLINGS, M. R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Front Microbiol**, v. 4, p. 4, 2013.

GOMIS-RUTH, F. X. et al. Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 13, p. 1551-65, 2004.

GONULLU, N. et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 1110-2, Mar 2008.

GOTTIG, S. et al. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 8, p. 1737-40, Aug 2013.

GOTTIG, S. et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 12, p. 828-9, Dec 2010.

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 2, p. 277-301, table of contents, Jun 2003.

GUBBINS, M. J.; WILL, W. R.; FROST, L. S. The F-plasmid, a paradigm for bacterial conjugation. In: *The Dynamic Bacterial Genome*. In: (ED.), M. P. (Ed.). Cambridge, UK.: Cambridge University Press, 2005. p.151–206.

HAMMERUM, A. M. et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 12, p. 829-30, Dec 2010.

HARRISON, E. et al. Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum. **Curr Biol**, v. 25, n. 15, p. 2034-9, Aug 3 2015.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1496-9, Sep 12 2003.

HO, P. L. et al. 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**, v. 1, n. 11, p. e39, Nov 2012.

HO, P. L. et al. Predominance of pHK01-like incompatibility group FII plasmids encoding CTX-M-14 among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Hong Kong, 1996-2008. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 2, p. 182-6, Jun 2012.

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 9, p. 5306-18, Sep 2003.

HRABAK, J. et al. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. **Euro Surveill**, v. 17, n. 7, 2012.

HUANG, T. W. et al. Copy Number Change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62774, 2013.

ISOZUMI, R. et al. *bla*(NDM-1)-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 8, p. 1383-5, Aug 2012.

JACOBY, G. A. K. B. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. in Lahey Clinic 2014.

JAHAGIRDAR, S.; PATWARDHAN, R.; DHAKEPHALKAR, P. K. Curing plasmid-mediated vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* using herbal naphthoquinones. **J Hosp Infect**, v. 70, n. 3, p. 289-91, Nov 2008.

JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 4, p. 499-513, Apr 2013.

JOHNSON, T. J. et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Plasmid**, v. 68, n. 1, p. 43-50, Jul 2012.

KAASE, M. et al. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 6, p. 1260-2, Jun 2011.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 10, p. 2253-4, Oct 2010.

KASAMATSU, H.; VINOGRAD, J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. **Annu Rev Biochem**, v. 43, n. 0, p. 695-719, 1974.

KIMURA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, n. 3, p. 241-4, Nov 2005.

KLIMKE, W. A.; FROST, L. S. Genetic analysis of the role of the transfer gene, *traN*, of the F and R100-1 plasmids in mating pair stabilization during conjugation. **J Bacteriol**, v. 180, n. 16, p. 4036-43, Aug 1998.

KOH, T. H. et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 12, p. 828, Dec 2010.

KUMARASAMY, K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 9, p. 597-602, Sep 2010.

LETCHUMANAN, V.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. **Front Microbiol**, v. 6, p. 735, 2015.

LINDSEY, R. L. et al. Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 7, p. 1908-15, Apr 2009.

LIVERMORE, D. M. Fourteen years in resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 4, p. 283-94, Apr 2012.

LIVERMORE, D. M. et al. Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 1, p. 390-4, Jan 2011.

LOFTIE-EATON, W. et al. Evolutionary Paths that Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance. **Mol Biol Evol**, Dec 14 2015.

LOWMAN, W. et al. NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. **S Afr Med J**, v. 101, n. 12, p. 873-5, Dec 2011.

MACRINA, F. L. et al. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. **Plasmid**, v. 1, n. 3, p. 417-20, Jun 1978.

MAIWALD, M. **Broad-range PCR for detection and identification of bacteria**. American Society for Microbiology, 2004.

MANAGEIRO, V. et al. Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal. **Genome Announc**, v. 3, n. 5, 2015.

MATHERS, A. J. et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **MBio**, v. 2, n. 6, p. e00204-11, 2011.

MATTHIAS KAHM, G. H., HELLA LICHTENBERG-FRATÉ, JOST LUDWIG, MAIK KSCHISCHO. grofit: Fitting Biological Growth Curves with R. **Journal of Statistical Software**, v. 33, n. 7, 2010.

MAZZARIOL, A. et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 3, p. 532-4, Mar 2012.

MCDERMOTT, H. et al. Isolation of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland, July 2011. **Euro Surveill**, v. 17, n. 7, 2012.

MCGANN, P. et al. Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying *bla*_(NDM-1) in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1673-9, Apr 2012.

MILLION-WEAVER, S.; CAMPS, M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? **Plasmid**, v. 75, p. 27-36, Sep 2014.

MOLNAR, A.; AMARAL, L.; MOLNAR, J. Antiplasmid effect of promethazine in mixed bacterial cultures. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, n. 3, p. 217-22, Sep 2003.

MORRISON, A.; COZZARELLI, N. R. Contacts between DNA gyrase and its binding site on DNA: features of symmetry and asymmetry revealed by protection from nucleases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 3, p. 1416-20, Mar 1981.

NAKAZAWA, Y. et al. A case of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* transferred from India to Japan. **J Infect Chemother**, v. 19, n. 2, p. 330-2, Apr 2013.

NEMEC, A.; KRIZOVA, L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the NDM-1 gene, Czech Republic, 2011. **Euro Surveill**, v. 17, n. 11, 2012.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 119-46, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1791-8, Oct 2011.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J Intern Med**, v. 252, n. 2, p. 91-106, Aug 2002.

NOVICK, R. P. Plasmid incompatibility. **Microbiol Rev**, v. 51, n. 4, p. 381-95, Dec 1987.

PARK, S. J.; SON, W. S.; LEE, B. J. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 6, p. 1155-67, Jun 2013.

PASTERAN, F. et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1795-7, Jul 2012.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S20-8; discussion S64-73, Jun 2006.

PEIRANO, G. et al. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 71, n. 2, p. 106-9, Oct 2011.

PENA-MILLER, R. et al. Evaluating the effect of horizontal transmission on the stability of plasmids under different selection regimes. **Mob Genet Elements**, v. 5, n. 3, p. 1-5, May-Jun 2015.

PEREIRA, C. A. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68144, 2013.

PERRY, J. A.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic. **Front Microbiol**, v. 4, p. 138, 2013.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N. 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**, v. 28, n. 4, p. 157-63, Aug 1997.

PFEIFER, Y. et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 1998-2001, Sep 2011.

PILLONETTO, M. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7592-4, Dec 2014.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 4281-3, Dec 2013.

POIREL, L. et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 12, p. 2781-3, Dec 2011.

POIREL, L. et al. Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM}-like genes in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1087-9, Feb 2012.

POIREL, L. et al. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4914-6, Nov 2010.

POIREL, L. et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2784-5, May 2012.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 2, p. 934-6, Feb 2011.

POIREL, L. et al. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 8, p. 1730-3, Aug 2011.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

PONCIANO, J. M. et al. The population biology of bacterial plasmids: a hidden Markov model approach. **Genetics**, v. 176, n. 2, p. 957-68, Jun 2007.

POOLE, T. L. et al. Conjugative transferability of the A/C plasmids from *Salmonella enterica* isolates that possess or lack *bla*_(CMY) in the A/C plasmid backbone. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 10, p. 1185-94, Dec 2009.

QUINONES, D. et al. 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**, v. 7, p. 52-6, Sep 2015.

RAWLINGS, D. E. Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the pas system of pTF-FC2. **FEMS Microbiol Lett**, v. 176, n. 2, p. 269-77, Jul 15 1999.

REYES-LAMOTHE, R. et al. High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 2, p. 1042-51, Jan 2014.

RIMRANG, B. et al. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing *Enterobacteriaceae* in Thailand. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2626-30, Nov 2012.

RUBIN, J. E. et al. NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* from South Africa: moving towards endemicity? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 79, n. 3, p. 378-80, Jul 2014.

SALJE, J. Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 45, n. 4, p. 296-317, Aug 2010.

SAMBROOK, J. J. A. D. D. W. R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, J. L. M. **Antibióticos na prática médica**. Sarvier, 2007.

SHRIRAM, V. et al. A potential plasmid-curing agent, 8-epidiosbulbin E acetate, from *Dioscorea bulbifera* L. against multidrug-resistant bacteria. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 5, p. 405-10, Nov 2008.

SLATER, F. R. et al. Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 66, n. 1, p. 3-13, Oct 2008.

SMILLIE, C. et al. Mobility of plasmids. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 434-52, Sep 2010.

SOLE, M. et al. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 9, p. 4402-4, Sep 2011.

SONNEVEND, A. et al. Emergence and spread of NDM-1 producer *Enterobacteriaceae* with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 7, p. 1044-50, Jul 2013.

SOTA, M. et al. Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. **ISME J**, v. 4, n. 12, p. 1568-80, Dec 2010.

SPENGLER, G. et al. The mechanism of plasmid curing in bacteria. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 7, p. 823-41, Jul 2006.

SUMMERS, D. K. The kinetics of plasmid loss. **Trends Biotechnol**, v. 9, n. 8, p. 273-8, Aug 1991.

SUN, F. et al. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China. **Front Microbiol**, v. 6, p. 458, 2015.

SUNG, J. Y. et al. Emergence of *Acinetobacter pittii* harboring New Delhi metallo-beta-lactamase genes in Daejeon, Korea. **Ann Lab Med**, v. 35, n. 5, p. 531-4, Sep 2015.

SZEKELY, E. et al. First description of *bla*_(NDM-1), *bla*_(OXA-48), *bla*_(OXA-181) producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 8, p. 697-700, Dec 2013.

TAPER, M. L. A. P., J. M. Evidential statistics as a statistical modern synthesis to support 21st century science. **Population Ecology**, v. 58, n. 1, p. 20, 24 December 2015 2016.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimeoterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

THOMAS, C. M. Paradigms of plasmid organization. **Mol Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 485-91, Aug 2000.

TORRES, E. et al. Reduced Susceptibility to Cefepime in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* Producing OXA-1 Beta-Lactamase. **Microb Drug Resist**, Aug 21 2015.

VILLA, L. et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB1* genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1645-50, Jul 2012.

WAILAN, A. M. et al. Genomic Characteristics of NDM-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Australia and Their *bla*_{NDM} Genetic Contexts. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 1, p. 136-41, 2015.

WALSH, M. C. et al. Controlling *Salmonella* infection in weanling pigs through water delivery of direct-fed microbials or organic acids. Part I: effects on growth performance, microbial populations, and immune status. **J Anim Sci**, v. 90, n. 1, p. 261-71, Jan 2012.

WANG, J. et al. Molecular characterization of *bla*_{ESBL}-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. **Front Microbiol**, v. 4, p. 188, 2013.

WINN, W., S. ALLEN, ET AL. . **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

WITZ, G.; STASIAK, A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 7, p. 2119-33, Apr 2010.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 2, p. 287-91, Feb 2014.

WU, H. S. et al. First identification of a patient colonized with *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{NDM-1} in Taiwan. **J Chin Med Assoc**, v. 73, n. 11, p. 596-8, Nov 2010.

YANG, J. et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 12, p. E506-13, Dec 2012.

YANG, P. et al. *bla*_{NDM-5} carried by an IncX3 plasmid in *Escherichia coli* sequence type 167. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7548-52, Dec 2014.

YONG, D. et al. 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**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, Dec 2009.

ZHAO, F. et al. Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10141, 2010.

ZMARLICKA, M. T.; NAILOR, M. D.; NICOLAU, D. P. Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. **Infect Drug Resist**, v. 8, p. 297-309, 2015.

ZUJIC ATALIC, V. et al. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia--the results of a multicentre study. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 11, p. O894-903, Nov 2014a.