

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Caracterização molecular de isolados da família *Enterobacteriaceae*
produtores da β -Lactamase OXA-370**

Cibele Massotti Magagnin

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Caracterização molecular de isolados da família *Enterobacteriaceae*
produtores da β -Lactamase OXA-370**

Cibele Massotti Magagnin

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Mello Sampaio
Tese apresentada como requisito para obtenção
de título de Doutor em Medicina: Ciências
Médicas

Porto Alegre

2017

Dedico este trabalho a todos que, de
alguma forma, me incentivam a ser melhor.

*“E quando estiver bem cansado, ainda
exista amor para recomeçar.”*

Roberto Frejat

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki, meu obrigada mais especial. Pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, por me incentivar a me dedicar à pesquisa, pelos ensinamentos tão ricos e, fundamentalmente, por ter tido a oportunidade de ver a ciência com um pouco dos teus olhos. És exemplar e admirável! Foi uma honra ter sido tua aluna!

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, pela orientação e pela imensa contribuição científica dedicada a este trabalho. Agradeço especialmente pelo período em que estive em seu laboratório e por ter me recebido de forma tão acolhedora. Foi um privilégio conviver e aprender com o senhor, e conhecer um profissional sério, justo e uma pessoa admirável. Meu obrigada cheio de carinho!

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth por compartilhar comigo conhecimento, alegrias, pelos conselhos e pela convivência diária e agradável durante este período no LABRESIS. Muito obrigada por ter participado deste trabalho! Tens meu carinho e admiração!

As colegas queridas e hoje grandes amigas, Franciéli Rozáles, Laura Antochervis, Luciana Nunes, Mariana Pagano e Vanessa Riberio. A vocês, meu agradecimento por terem me ensinado sobre microbiologia e, sobretudo, sobre amizade. Vocês são mais que especiais!

Aos colegas do LABRESIS por compartilharem comigo experimentos, bons momentos, cafés e pelo companheirismo no decorrer deste período. Obrigada!

A todos os alunos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial aos queridos amigos Juliana Campos e Darlan da Rocha. Meu muitíssimo obrigada pela fundamental contribuição e comprometimento no desenvolvimento deste trabalho. E agradeço, acima de tudo, pela amizade e pelo carinho que nos aproxima apesar da distância geográfica.

As bolsistas de iniciação científica que se envolveram de forma direta ou indireta com a execução das atividades experimentais deste projeto. Meu agradecimento pela dedicação e pelo empenho!

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas, em especial ao Everaldo Batista, por serem sempre solícitos e colaborativos.

Aos profissionais do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo pelo acolhimento e apoio.

A equipe do setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury, em especial ao Valdemir Carvalho, pela colaboração e ensinamentos nas atividades de espectrometria.

Aos meus tios, Neca e Juliano, pelo amor e apoio incondicionais de sempre, em especial durante minha estada em São Paulo.

A minha família, em especial a minha mãe e aos meus irmãos, pelo apoio e compreensão, e por terem dividido comigo mais uma etapa desta jornada. Gratidão e amor!

Aos amigos e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!

RESUMO

Base teórica: As carbapenemases são β -lactamases capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, importante opção terapêutica nas infecções causadas por enterobactérias. A carbapenemase OXA-48 e suas variantes estão entre as principais carbapenemases encontradas em *Enterobacteriaceae* disseminadas em todo o mundo. A OXA-370, que difere da OXA-48 por um único aminoácido, foi detectada pela primeira vez em 2013 na cidade de Porto Alegre, e até o momento só há relatos de sua detecção no Brasil.

Objetivos: Caracterizar isolados produtores de OXA-370 quanto ao perfil de sensibilidade aos β -lactâmicos, sobretudo carbapenêmicos, e investigar o contexto genético em que o gene *bla*_{OXA-370} está inserido.

Métodos: Foram avaliados isolados obtidos a partir de um estudo de vigilância para o monitoramento de enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. A detecção dos genes de carbapenemases (*bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like} e *bla*_{VIM}) foi realizada por PCR Real Time HRM. Os isolados positivos para *bla*_{OXA-48-like} foram confirmados por PCR convencional e os produtos foram purificados e sequenciados. A relação clonal dos isolados produtores de OXA-370 foi avaliada pela técnica de macrorrestrição do DNA seguido de PFGE e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram analisadas por E-test® e/ou microdiluição em caldo. Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e inseridos em *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação. Bibliotecas de DNA plasmidial foram preparadas utilizando-se o kit Nextera DNA e a seguir foram sequenciadas no sistema MiSeq. As sequências foram montadas utilizando-se o programa SeqMan NGen e os contigs foram alinhados utilizando-se o SeqMan Pro. A plataforma RAST foi utilizada para anotação automática das sequências e a curadoria manual foi realizada utilizando-se o programa ARTEMIS. As sequências completas dos plasmídeos foram comparadas as disponíveis no GenBank utilizando-se o BLAST. As sequências de nucleotídicas dos plasmídeos foram alinhadas utilizando-se o BioEdit.

Resultados: Um total de 4.451 enterobactérias foram avaliadas, provenientes de 28 hospitais do Rio Grande do Sul no período de abril de 2013 a abril de 2015. O gene *bla*_{OXA-48-like} foi detectado em 74 (2,5%) isolados não sensíveis a pelo menos um dos carbapenêmicos. Quanto à distribuição segundo a gênero e/ou espécie, o gene foi detectado em *Enterobacter* spp. (44,6% complexo *E. cloacae* e 2,7% *E. aerogenes*) e

Klebsiella spp. (31,1% *K. pneumoniae* e 6,7% *K. oxytoca*), seguido por *Escherichia coli*, (6,7%), *Morganella morganii*, (2,7%), *Citrobacter freundii* (1,3%), *Proteus mirabilis* (1,3%), *Providencia stuartii* (1,3 %) e *Serratia* spp. (1,3%). Estes isolados foram provenientes de cinco hospitais, sendo 67 (90,5%) do hospital onde o gene *bla*_{OXA-370} foi detectado pela primeira vez. O sequenciamento de *bla*_{OXA-48-like} foi realizado em 52 isolados, incluindo *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *C. freundii*; todos apresentando 100% de identidade com *bla*_{OXA-370}. A PFGE revelou a presença de clones distintos entre *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* e *E. coli*. As taxas de susceptibilidade ao meropenem, imipenem e ertapenem entre os isolados produtores de OXA-370 foram 92,3%, 78,8% e 7,7%, respectivamente; a CIM50/CIM90 foram 0,38/2 mg/L e 1/3 mg/L para meropenem e imipenem, respectivamente. Um total de seis plasmídeos tiveram suas sequências nucleotídicas completas determinadas. Todos eram circulares e o conteúdo de GC variou entre 46,7 e 47,2%. Os plasmídeos sequenciados pertencem ao grupo de incompatibilidade IncX e apresentam tamanho aproximado a 70kbp. Além de *bla*_{OXA-370} e genes de mobilização, os plasmídeos albergavam também *bla*_{CTX-M-8}. A análise das sequências mostrou que *bla*_{OXA-370} está localizado em um transpóson composto, contendo quatro genes que codificam transposases, designado Tn6435.

Conclusão: Em geral, a análise de susceptibilidade antimicrobiana sugere que a presença de OXA-370 não acarreta impacto significativo no perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos meropenem e imipenem nos isolados de enterobactérias avaliados neste estudo. Além disso, foi possível observar que o gene *bla*_{OXA-370} está disseminado entre diversas espécies e clones de *Enterobacteriaceae*, indicando um alto potencial de disseminação. Por meio da análise da sequência de plasmídeos carreadores de *bla*_{OXA-370} foi possível identificar um novo elemento genético móvel, designado transpóson Tn6435, o qual está associado a disseminação de OXA-370 em isolados de enterobactérias no Rio Grande do Sul.

Palavras- chave: *Enterobacteriaceae*, β -lactamase, carbapenemase, OXA-48-like, OXA-370, Tn6435

SUMMARY

Background: Carbapenemases are β -lactamases capable of hydrolyzing carbapenems, an important therapeutic option in infections caused by enterobacteria. OXA-48 carbapenemase and its variants are among the major carbapenemases found in *Enterobacteriaceae* worldwide. OXA-370, which differs from OXA-48 by a single amino acid, was detected for the first time in 2013 in the city of Porto Alegre, and until the moment there are only reports of its detection in Brazil.

Objectives: To characterize OXA-370 isolates in relation to the β -lactam susceptibility profile, especially carbapenems, and to investigate the genetic context in which the *bla*_{OXA-370} gene is inserted.

Methods: Isolates obtained from a surveillance study for the monitoring of enterobacteria with reduced sensitivity to carbapenems were evaluated. Detection of the carbapenemases genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{VIM}) was performed by Real Time HRM PCR. *bla*_{OXA-48-like} positive isolates were confirmed by standard PCR and the products were purified and sequenced. The clonality of OXA-370-producing isolates was evaluated by the DNA macrorestriction followed by PFGE and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were analyzed by E-test® and / or broth microdilution. Plasmids were extracted by alkaline lysis and inserted into *Escherichia coli* TOP10 by electroporation. Plasmid DNA libraries were prepared using the Nextera DNA kit and then sequenced in the MiSeq system. Sequences were assembled using the SeqMan NGen program and the contigs were aligned using SeqMan Pro. The RAST platform was used for automatic annotation of sequences and manual curation was performed using the ARTEMIS program. The complete sequences of the plasmids were compared to those available on GenBank using BLAST. The nucleotide sequences of the plasmids were aligned using BioEdit.

Results: A total of 4,451 enterobacteria from 28 hospitals in Rio Grande do Sul were evaluated from April 2013 to April 2015. The *bla*_{OXA-48-like} gene was detected in 74 (2.5%) isolates non-susceptible to at least one of the carbapenems. Regarding the distribution according to genus and / or species, the gene was detected in *Enterobacter* spp. (44.6% *E. cloacae* complex and 2.7% *E. aerogenes*) and *Klebsiella* spp. (31.1% *K. pneumoniae* and 6.7% *K. oxytoca*), followed by *Escherichia coli* (6.7%), *Morganella morganii* (2.7%), *Citrobacter freundii* (1.3%), *Proteus mirabilis* (1.3%), *Providencia stuartii* (1.3%) and *Serratia* spp. (1.3%). These isolates came from five hospitals, but 67 (90.5%) were

detected in the same hospital where the *bla*_{OXA-370} gene was detected for the first time. Complete sequencing of the *bla*_{OXA-48-like} gene was performed in 52 isolates, including *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* and *C. freundii*; all showing 100% identity with *bla*_{OXA-370}. PFGE revealed the presence of distinct clones among *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* and *E. coli*. The susceptibility rates for meropenem, imipenem and ertapenem among OXA-370-producing isolates were 92.3%, 78.8% and 7.7%, respectively; the MIC₅₀ / MIC₉₀ were 0.38 / 2 mg / L and 1/3 mg / L for meropenem and imipenem, respectively. A total of six plasmids had their complete nucleotide sequences determined. All were circular and the GC content varied between 46.7 and 47.2%. The sequenced plasmids belong to the IncX incompatibility group and are approximately 70 kbp in size. In addition to *bla*_{OXA-370} and mobilization genes, the plasmids harbored also the *bla*_{CTX-M-8}. *In silico* analysis showed that *bla*_{OXA-370} is located in a composite transposon, containing four genes encoding transposases, designated Tn6435.

Conclusion: In general, the antimicrobial susceptibility analysis suggests that the presence of OXA-370 does not have a significant impact on the meropenem and imipenem carbapenems susceptibility profiles of the enterobacteria evaluated in this study. In addition, it was possible to observe that the *bla*_{OXA-370} gene is disseminated among several *Enterobacteriaceae* species and clones, indicating a high potential for dissemination. Analysis of the plasmids containing the *bla*_{OXA-370} gene evidenced a new mobile genetic element, designated Tn6435 transposon, which is associated with the dissemination of *bla*_{OXA-370} in enterobacteria isolates in Rio Grande do Sul.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, β -lactamase, carbapenemases, OXA-48-like, OXA-370, Tn6435

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos β -lactâmicos.....	17
Figura 2. Árvore filogenética de similaridade entre sequências de aminoácidos de enzimas da família OXA-48 e de outras OXAs codificadas por genes encontrados no cromossomo de <i>Shewanella</i> spp.	31
Figura 3. Distribuição geográfica dos países de primeiros relatos de OXA-48 e derivadas	41
Figura 4. Estruturas da plataforma genética Tn1999 e suas derivadas que abrigam OXA-48..	43
Figura 5. Árvore de similaridade entre os genomas de IncL e IncM e agrupamento de alguns determinantes de resistência.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -Lactamases.....	20
Tabela 2. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de OXA-48 e seus países de identificação....	33
Tabela 3. Primeiras descrições de variantes de OXA-48 e suas características.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Ácido Clavulânico

CIM - Concentração Inibitória Mínima

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid

ESBL - *Extended Spectrum B-Lactamase*

EUA – Estados Unidos da América

Inc - Grupo de incompatibilidade de plasmídeo

IS – *Insertion Sequence*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

MBL - Metallo-B-Lactamases

MLST - *Multilocus Sequence Typing*

NAG - N-acetilglucosamina

NAM- N-acetilmurâmico

OXA - Oxacilinase

PBPs - *Penicillin-Binding Proteins*

PBRT - *PCR-Based Replicon Typing*

PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

ST - *Sequence Type*

Tn – Transpóson

TZB - Tazobactam

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1.	β-Lactâmicos	16
2.1.1	<i>Histórico</i>	16
2.1.2	<i>Mecanismos de ação</i>	17
2.2	β-Lactamases	18
2.3	Carbapenemases	22
2.3.1	Carbapenemases de Classe A	22
2.3.1.1	<i>Carbapenemases de Classe A cromossômicas</i>	22
2.3.1.2	<i>Carbapenemases de Classe A adquiridas</i>	23
2.3.2	Carbapenemases de Classe B	26
2.3.3	Carbapenemases de Classe D	27
2.4	OXA-48	29
2.4.1	Origem da OXA-48	29
2.4.2	Aspectos gerais	32
2.4.3	Epidemiologia	33
2.4.4	Plataforma genética de <i>bla</i> _{OXA-48}	41
2.4.5	Plasmídeos envolvidos na disseminação de OXA-48	44
2.4.6	Epidemiologia molecular	46
2.4.7	OXA-370	47
3.	JUSTIFICATIVA	51
4.	OBJETIVOS	52
4.1	Específicos	52
5.	ARTIGOS CIENTÍFICOS	53
5.1	Artigo I	53
Dissemination of <i>bla</i> _{OXA-370} gene among several <i>Enterobacteriaceae</i> species in Brazil	53	
5.2	Artigo II	62
Dissemination of <i>bla</i> _{OXA-370} is mediated by IncX plasmids and the Tn6435 transposon	62	
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7.	REFERÊNCIAS	77
8.	ANEXO	98
8.1	Trabalhos publicados em colaboração	98

1. INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bacilos gram-negativos de exigências nutricionais simples e caracterizados bioquimicamente por serem fermentadores da glicose, catalase positiva e oxidase negativa (Forsythe *et al.*, 2015).

As enterobactérias podem ser encontradas em vários nichos ecológicos, como solo e água, e também como saprófitas em humanos e outros mamíferos, colonizando o trato gastrointestinal, a pele e a nasofaringe (Forsythe *et al.*, 2015). Além disso, são considerados importantes agentes de infecções comunitárias e hospitalares devido à sua facilidade de disseminação entre seres humanos (Partridge, 2011; Toleman & Walsh, 2011).

Os gêneros e espécies de maior importância clínica são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., sendo *E. coli*, *Klebsiella* spp., e *Enterobacter* spp. os principais microrganismos associados a infecções relacionadas aos cuidados com a saúde (Forsythe *et al.*, 2015, Hidron *et al.*, 2008).

Devido à sua eficácia e segurança, os β -lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, são os antimicrobianos mais utilizados para tratamento de infecções causadas por enterobactérias (Suárez & Gudiol, 2009). Contudo, a resistência a estes antibióticos entre membros da família *Enterobacteriaceae* limita as opções terapêuticas.

Há quatro tipos conhecidos de mecanismos de resistência aos β -lactâmicos: alteração das PBPs, alteração da permeabilidade da membrana externa, aumento da regulação do sistema de efluxo e produção de β -lactamases (Pfeifer *et al.*, 2010). A produção de β -lactamase é o mecanismo de resistência de maior impacto clínico e epidemiológico encontrado em enterobactérias e outros bacilos gram-negativos clinicamente relevantes (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

Atualmente, a grande variedade de β -lactamases, como AmpC, ESBL e carbapenemases são consideradas a principal causa para o aumento da resistência a β -lactâmicos em enterobactérias (Livermore, 2009). Indiscutivelmente, as carbapenemases são as enzimas consideradas de maior importância clínica e epidemiológica. Elas são capazes de hidrolisar os antibióticos carbapenêmicos, os quais são estáveis frente à maioria das β -lactamases produzidas por bacilos gram-negativos e, por isso, muitas vezes

são os únicos antibióticos que permanecem ativos contra isolados produtores de AmpC e ESBL (Pitout *et al.*, 2008).

As carbapenemases são classificadas de acordo com suas características funcionais e estrutura do seu sítio ativo. Há dois sistemas de classificação, sendo o primeiro considerando classes moleculares A, B e D de Ambler (1980) e o segundo, grupos funcionais 2df, 2f, 3a e 3b de Bush & Jacoby (2010).

Os três grupos de carbapenemases mais frequentemente detectadas em *Enterobacteriaceae* são: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NDM (New Delhi Metalo-betalactamase) e OXA-48. A OXA-48 é a β -lactamase de classe D considerada importante determinante de resistência a carbapenêmicos em enterobactérias (Poirel *et al.*, 2004b). Essa característica, associado ao fato de ser uma enzima codificada por plasmídeo, agrava as consequências de sua disseminação. Diversas variantes de OXA-48 já foram descritas e este grupo de enzimas constitui as β -lactamases predominantes em *Enterobacteriaceae* em diversos países. No entanto, nem todas as enzimas do tipo OXA-48 são capazes de hidrolisar carbapenêmicos.

A OXA-370, uma variante de OXA-48, foi descrita em 2013 (Sampaio *et al.*, 2014) como representante das β -lactamases de classe D encontradas em *Enterobacteriaceae* no Brasil. Originalmente, *bla*_{OXA-370} foi identificado no Rio Grande do Sul, em um isolado do complexo *Enterobacter cloacae* com sensibilidade reduzida ao imipenem e resistente ao ertapenem. Subsequentemente, o gene *bla*_{OXA-370} foi detectado em cinco hospitais do Rio de Janeiro, em enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Todavia, até o momento, são conhecidas poucas características desta enzima. A implementação de um estudo que permita o conhecimento da prevalência deste gene em isolados de *Enterobacteriaceae* do Rio Grande do Sul, o impacto da presença desta enzima no perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos e o ambiente genético em que *bla*_{OXA-370} está inserido faz-se necessário para a compreensão da epidemiologia e caracterização molecular deste mecanismo de resistência presente no Brasil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. β -Lactâmicos

2.1.1 Histórico

Os antibióticos β -lactâmicos constituem a classe de antimicrobianos mais numerosa e mais utilizada na prática clínica. Estão entre os fármacos com maior eficácia para tratamento de infecções bacterianas causadas por diferentes espécies e representam a classe de agentes antibacterianos mais frequentemente prescritos (Suárez & Gudiol, 2009).

O descobrimento do primeiro β -lactâmico, a penicilina, é atribuído a Alexandre Fleming que em 1928 observou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* era inibido na presença de *Penicillium notatum* (Fleming, 1929). A substância produzida por estes fungos era capaz de inibir o crescimento não somente de diferentes tipos de estafilococos, mas também de muitos estreptococos. Contudo, apesar da efetividade observada *in vitro*, a penicilina foi utilizada clinicamente pela primeira vez somente em meados de 1940 (Suárez & Gudiol, 2009).

Após mais de 70 anos, a penicilina continua sendo o fármaco de primeira escolha para tratamento de algumas doenças como a sífilis e a faringite por estreptococo e, atualmente, a família dos β -lactâmicos é a mais utilizada no tratamento de diversas infecções (Suárez & Gudiol, 2009).

A presença do anel β -lactâmico caracteriza bioquimicamente a estrutura básica dos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e determina o mecanismo de ação destes fármacos, fundamentada na inibição das transpeptidases e conseqüentemente da síntese da parede celular. O fato de o alvo ser a parede celular, estrutura sem homólogo em eucariotos, explica a sua baixa toxicidade e segurança no uso em gestantes e crianças (Suárez & Gudiol, 2009).

Para que o anel β -lactâmico seja ativo é preciso que ele esteja unido a outros radicais, geralmente outro anel. A associação destes dois anéis a diferentes tipos de cadeias lineares dá origem a diferentes grupos de β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactams e inibidores de β -lactamases, conforme apresentado na Figura 1 (Suárez & Gudiol, 2009). Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química são capazes de modificar as características dos

antibióticos como o espectro de ação, afinidade por determinados receptores e diferentes níveis de resistência frente a enzimas capazes de degradar os β -lactâmicos (β -lactamases). A produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência a estes antibióticos (García *et al.*, 1999).

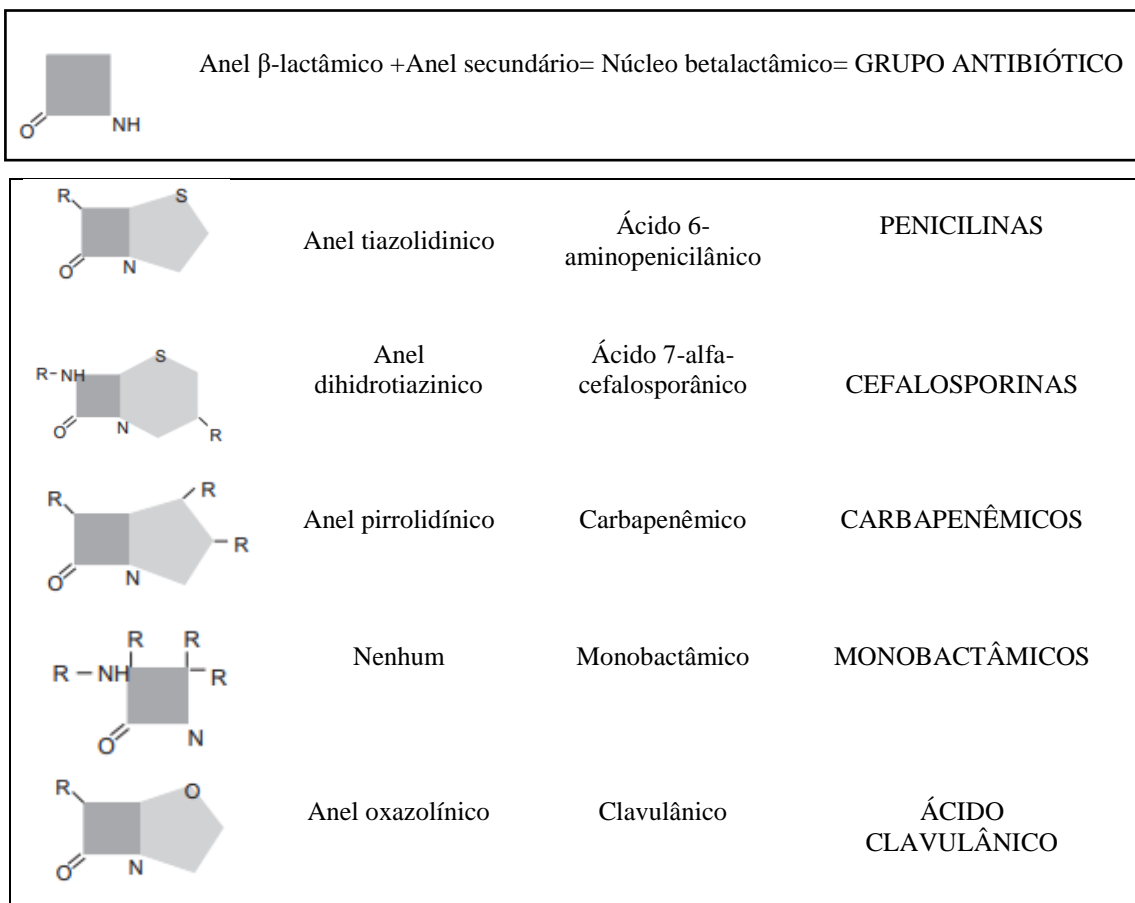


Figura 1. Estrutura dos β -lactâmicos. Reproduzido de Suárez & Gudiol, 2009.

2.1.2 Mecanismos de ação

Os β -lactâmicos são agentes bactericidas que atuam interferindo na síntese da parede celular através da atuação sobre a biossíntese de peptidoglicanos e indução da autólise bacteriana. Os peptidoglicanos são os principais constituintes da parede celular bacteriana e constituem uma rede tridimensional que circunda a membrana celular e protege contra o choque osmótico, além de manter o formato e a rigidez da parede celular em gram-positivos e gram-negativos (Matagne *et al.*, 1998).

A parede celular bacteriana é composta por monômeros de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG). O ácido murâmico fixa cadeias de tetrapeptídeos que se unem e formam uma malha. Os diferentes componentes de peptidoglicanos são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática ao espaço periplasmático, onde vão se unir para formar as unidades de peptideoglicanos. A ligação entre as cadeias com repetições de NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídicos das moléculas de NAM que possuem um terminal com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. No espaço periplasmático, transpeptidases, também denominadas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), ligam covalentemente esses dois resíduos. Essas ligações se repetem ao longo de toda parede celular e são essenciais para conferir rigidez e estabilidade. O anel β -lactâmico apresenta similaridade estrutural com a região dos pentapeptídeos unidos pelas PBPs; por isto, ele é capaz de se unir a elas de forma covalente e impedir a formação da parede celular. Os β -lactâmicos também atuam ativando as autolisinas endógenas que destroem o peptideoglicano (Matagne *et al.*, 1998; Suárez & Gudiol, 2009).

Os β -lactâmicos são a classe de antimicrobianos mais segura em uso clínico, por isso, infecções causadas por bactérias resistentes a esses agentes são consideradas um desafio terapêutico. A resistência aos β -lactâmicos pode ocorrer por quatro mecanismos: alteração das PBPs, alteração da permeabilidade da membrana externa, aumento da regulação do sistema de efluxo e produção de β -lactamases (Pfeifer *et al.*, 2010). Devido ao impacto na epidemiologia da resistência bacteriana, as β -lactamases serão discutidas com mais detalhes.

2.2 β -Lactamases

A produção de β -lactamases é o mais importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos encontrado em enterobactérias e outros bacilos gram-negativos clinicamente relevantes (Suárez & Gudiol, 2009; Martínez-Martínez & González-López, 2014). Penicilinas, cefalosporinas, carbapenênicos e monobactâmicos podem ser hidrolisados por diversas β -lactamases. Sabendo que estes antimicrobianos frequentemente são opções de escolha de tratamento de muitas doenças infecciosas, a presença e as características destas enzimas desempenham papel crítico na escolha de terapia apropriada (Pitout *et al.*, 2008)

As β -lactamases podem ser classificadas em diferentes grupos, de acordo com suas propriedades bioquímicas, funcionais e moleculares (Queenan & Bush, 2007). As classificações mais utilizadas são as propostas por Ambler (Ambler, 1980) e por Bush & Jacob (2010).

Ambler agrupou as β -lactamases de acordo com a sequência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas e as incluiu em quatro classes denominadas: A) β -lactamases de espectro estendido (ESBLs); B) metalo- β -lactamases (MBLs); C) cefalosporinases cromossômicas (AmpCs); e D) oxacilinasas (OXAs). As enzimas das classes A, C e D possuem o aminoácido serina no sítio ativo e são chamadas serino- β -lactamases, enquanto as enzimas da classe B possuem íon de zinco no sítio ativo e por isso são denominadas metalo- β -lactamases.

A classificação proposta por Bush & Jacoby divide as β -lactamases em quatro grupos funcionais, de acordo com a capacidade de hidrolisar classes específicas de β -lactâmicos e na capacidade de serem inibidos por compostos como o ácido clavulânico, tazobactam ou EDTA.

A tabela 1 apresenta a correlação entre as duas classificações e exibe de forma sucinta as características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamses.

Tabela 1. Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -Lactamases.

Classificação de Bush e Jacoby, 2010	Classificação de Ambler, 1989	Inibidor		Características funcionais	Exemplos importantes
		AC ou TZB	EDTA		
1	C	Não	Não	Hidrolisa cefalosporinas, cefamicinas e penicilinas, geralmente com taxa maior hidrólise para cefalosporinas	AmpC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> , CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99
1e	C	Não	Não	Hidrolisa penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	GC1, CMY-37
2a	A	Sim	Não	Hidrolisa eficientemente penicilinas	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> spp.
2b	A	Sim	Não	Hidrolisa eficientemente penicilinas, cefaloridina, cefazolina e cefalotina	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90
2be	A	Sim	Não	Hidrolisa penicilinas, cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	ESBLs- CTX-M-15, PER-1, VEB-1, TEM-3, TEM-10, SHV-2, SFO-1, TEM-26
2br	A	Não	Não	Hidrolisa eficientemente as penicilinas, a cefaloridina, a cefazolina e a cefalotina	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2bre	A	Não	Não	Hidrolisa penicilinas, cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	TEM 50, TEM, 68, TEM-89

Tabela 1. Continuação

Classificação de Bush e Jacoby, 2010	Classificação de Ambler, 1989	Inibidor		Características funcionais	Enzimas
		AC ou TZB	EDTA		
2c	A	Sim	Não	Hidrolisa eficientemente a carbenicilina	CARB-3, PSE-1
2ce	A	Sim	Não	Hidrolisa eficientemente carbenicilina, cefepime e ceftiofama	RTG-4
2d	D	Variável	Não	Hidrolisa eficientemente cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Variável	Não	Hidrolisa penicilinas e cefalosporinas de espectro ampliado	ESBLs- OXA-11, OXA-15
2df	D	Variável	Não	Hidrolisa carbapenênicos e cloxacilina ou oxacilina	OXA-23, OXA-48
2e	A	Sim	Não	Hidrolisa eficientemente cefalosporinas	CepA
2f	A	Variável	Não	Hidrolisa carbapenênicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas	IMI-1, SME-1, KPC-2, KPC-3, GES-2
3a	B (B1)	Não	Sim	Hidrolisa todos os antimicrobianos β -lactâmicos	IMP-1, VIM-1, NDM-1,
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Não	Sim	Hidrolisa preferencialmente carbapenênicos	CphA, Sfh-1

Abreviaturas: AC (Ácido Clavulânico); TZB (Tazobactam). Adaptado de Bush & Jacoby (2010).

2.3 Carbapenemases

As carbapenemases são β -lactamases capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, considerados o grupo de β -lactâmicos com maior espectro de ação por serem estáveis frente à maioria das β -lactamases. Estão inseridas nas classes moleculares A, B e D de Ambler e nos grupos funcionais 2df, 2f, 3a e 3b de Bush & Jacoby.

Até o início dos anos 90, as carbapenemases eram descritas como β -lactamases localizadas no cromossomo e apresentavam pouca importância epidemiológica. No entanto, a identificação em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transpósons e integrons, mudou os padrões de disseminação de destas enzimas, visto que estes elementos podem facilmente ser transferidos entre isolados bacterianos por mecanismos de conjugação (Queenan e Bush, 2007).

2.3.1 Carbapenemases de Classe A

As serino-carbapenemases de classe A de Ambler pertencem ao grupo funcional 2f e têm sido reportadas em isolados clínicos desde a sua descoberta, há mais de 20 anos (Nordmann, 2014). Este grupo de carbapenemases tem a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e podem ser inibidos pelo ácido clavulânico e tazobactam.

As principais famílias de carbapenemases de classe A incluem: KPC, GES, NMC-A/IMI, SME, SFC e BIC (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007). As bactérias que expressam estas enzimas podem exibir desde alto grau de resistência aos carbapenêmicos até concentrações inibitórias mínimas (CIMs) situadas abaixo dos pontos de corte de sensibilidade. Estas enzimas podem ser cromossomais ou adquiridas por elementos genéticos móveis, como plasmídeos (Queenan & Bush, 2007).

2.3.1.1 Carbapenemases de Classe A cromossômicas

O aparecimento destas carbapenemases deu-se no início dos anos 80, com a identificação de enzimas da família SME (*Serratia marcescens* enzymes), a qual consiste de cinco variantes enzimáticas, SME-1, SEM-2 e SME-3, SME-4, SME-5, que diferem entre si por um único aminoácido e são encontradas em *Serratia marcescens* (Queenan et

al., 2006; Queenan et al., 2000; ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab). A SME-1 foi detectada pela primeira vez em 1982, na Inglaterra. Subsequentemente, as variantes SME-2 e SME-3 foram detectadas em regiões dos EUA e na Argentina, onde foram responsáveis por surtos (Pasteran et al., 2009; Queenan et al., 2000). No Brasil, a SME-4 foi identificada recentemente em *S. marcescens* isolada no Rio de Janeiro e resistente a meropenem, imipenem (Cayô et al., 2017). Embora relativamente esporádicos, relatos demonstram a capacidade destas enzimas de conferir resistência ao imipenem e resultar em perfis variáveis de sensibilidade aos demais β -lactâmicos (Fairfax et al., 2011; Carrère et al., 2008a).

As enzimas NMC-A/IMI (*Not Metalloenzyme Carbapenemase/ Imipenemase*) também foram descritas há mais de 20 anos, identificadas originalmente na França, no cromossomo de *Enterobacter cloacae* (Nordmann et al., 1993). Ambas apresentam sequência de aminoácidos com 97% de identidade e perfil hidrolítico semelhante, que inclui aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalotina, imipenem e aztreonam. Apesar destas enzimas serem comumente codificadas por genes localizados no cromossomo, uma variante de IMI-1, a IMI-2, foi originalmente identificada em plasmídeo de *Enterobacter asburiae* isolado de ambiente nos EUA (Patel & Bonomo, 2013).

SFC-1 e BIC-1 são as serino-carbapenemases recuperadas originalmente de isolados ambientais. A primeira foi recuperada de *Serratia fonticola* isolada em Portugal em 2004 e a segunda de *Pseudomonas fluorescens* isolada do Rio Sena, em 2010 (Girlich et al., 2010; Henriques et al., 2004).

Embora as carbapenemases de classe A codificadas por genes de localização cromossômica tenham sido identificadas inicialmente na década de 80, a importância clínica destas enzimas permanece pequena.

2.3.1.2 Carbapenemases de Classe A adquiridas

As famílias carbapenemases de classe A adquiridas são consideradas as de maior importância clínica por estarem localizadas em elementos genéticos móveis, o que facilita a transferência da resistência entre isolados bacterianos (Queenan & Bush, 2007). As enzimas família GES e KPC são as representantes mais importantes desta categoria.

As enzimas do tipo GES (*Guiana extended-spectrum*) são codificadas por genes de localização plasmidial e já foram identificadas em *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii* (Poirel *et al.*, 2000; Castanheira *et al.*, 2004). Os genes que codificam para estas enzimas frequentemente são identificados em de integrons de classe 1, abrigados em plasmídeos transferíveis (Bonnin *et al.*, 2013; Walther-Rasmussen and Høiby, 2007). A primeira representante, GES-1, foi descoberta em 2000 e apresenta perfil de hidrólise semelhante àquele de ESBLs. Porém, uma substituição na posição 170 do sítio catalítico alterou o seu perfil de hidrólise que passou a incluir carbapenêmicos. A primeira enzima com atividade de carbapenemase descrita foi a GES-2, encontrada em uma *P. aeruginosa* multiresistente isolada na África do Sul (Poirel *et al.*, 2001).

Atualmente, existem 31 variantes de GES conhecidas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>). Entretanto, apenas algumas hidrolisam carbapenêmicos (Nass *et al.*, 2016). Embora raras, as carbapenemases do tipo GES já foram encontradas em todo mundo, geralmente associadas a casos esporádicos. Contudo, surtos de produtores de GES foram relatados em Portugal, Coreia, África do Sul e Brasil (Duarte *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2006; Picão *et al.*, 2009; Nass *et al.*, 2016).

No Brasil, a variante GES-5 já foi identificada em *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *Kluyvera intermedia*. Contudo, relatos desta enzima ainda são esporádicos. (Castanheira *et al.*, 2004; Nodari *et al.*, 2017; Picão *et al.*, 2009; Picão *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014a; Ribeiro *et al.*, 2014b).

Indiscutivelmente, as enzimas da família KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são as carbapenemases de classe A de maior importância clínica e epidemiológica. Já foram detectadas em praticamente todos os membros da família *Enterobacteriaceae* de importância clínica e em espécies de não-fermentadores como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (Walsh, 2010; Carrara-Marroni *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2016).

A primeira detecção de KPC ocorreu em 1996, em *K. pneumoniae* identificada na Carolina do Norte (Yigit *et al.*, 2001). Este isolado mostrou-se resistente a todos os β -lactâmicos testados, incluindo carbapenêmicos. Após o primeiro relato, a KPC apresentou rápida expansão nos EUA e países da Europa e, atualmente, é a carbapenemase mais disseminada mundialmente. Os países com alta prevalência de isolados produtores de

KPC incluem EUA, Colômbia, Brasil, Itália, Grécia, e países da Ásia Oriental, em particular a China (Iovleva & Doi, 2017). No Brasil, a KPC é considerada endêmica em todo país. Embora seja frequentemente encontrada em *K. pneumoniae*, este grupo de enzimas encontra-se presente em outras espécies de enterobactérias e em espécies não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Sampaio & Gales, 2015; Ribeiro *et al.*, 2012).

Atualmente, foram identificadas 23 variantes de KPC, sendo KPC-2 e KPC-3, que diferem de apenas um aminoácido, as mais frequentemente relatadas (Poirel *et al.*, 2007; Nass *et al.*, 2016). A descrição inicial da KPC-1 continha um erro de sequenciamento e na verdade as sequências de aminoácidos de KPC-1 e KPC-2 são idênticas, prevalecendo a designação KPC-2.

Outras enzimas de classe A localizadas em elementos genéticos móveis foram caracterizadas, porém, são pouco encontradas. A IBC-1 (*Integron Born Cephalosporinase*) foi identificada em 2000, em *E. cloacae* detectada na Grécia. Esta enzima difere de GES-1 por um aminoácido, e hidrolisa ceftazidima eficientemente, mas não apresenta degradação significativa de carbapenêmicos (Giakkoupi *et al.*, 2000). Devido as semelhanças encontradas entre as enzimas GES e IBC, alguns autores adotaram a nomenclatura consenso GES/IBC (Queenan & Bush, 2007).

A FRI-1 (French *imipenemase*) foi detectada em 2015, em plasmídeo de um *E. cloacae* isolado na França. Esta enzima compartilha sequência de aminoácidos com semelhança de 51 a 55% com outras carbapenemases descritas e hidrolisa significativamente carbapenêmicos e aztreonam, mas não confere resistência significativa a cefalosporinas de espectro estendido com ceftazidima, cefotaxima e cefepime (Dortet *et al.*, 2015a).

No Brasil, Nicoletti e colaboradores (2015) identificaram uma nova carbapenemase de classe A denominada BKC-1 (*Brazilian Klebsiella Carbapenemase-1*). Esta enzima foi originalmente encontrada em plasmídeo não conjugativo de cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, provenientes de dois centros médicos da cidade de São Paulo. Estudos de hidrólise demonstraram que a BKC-1 hidrolisa não apenas carbapenêmicos, mas também penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Subsequentemente a este estudo, Martins e colaboradores (2016) identificaram a presença do mesmo plasmídeo carreador de *bla*_{BKC-1} em isolado de *K. pneumoniae* resistente à polimixina B. Até o momento, são poucos os relatos de detecção de BKC-1 no país.

2.3.2 Carbapenemases de Classe B

As carbapenemases de classe B ou metalo- β -lactamase (MBLs) são reconhecidas pela capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e não hidrolisar monobactâmicos. As enzimas desta classe caracterizam-se por não serem afetadas pelos inibidores clássicos de β -lactamases, como o ácido clavulânico e o tazobactam, e serem inibidas pelos quelantes de metais, como o EDTA, o ácido mercaptopropiônico e o ácido dipicolínico (Queenan & Bush, 2007).

Diferentemente do cenário atual, em que a maioria das enzimas desta classe são mediadas por plasmídeos, historicamente as primeiras metalo- β -lactamases descritas eram codificadas por genes localizados no cromossomo de *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* (Patel & Bonomo, 2013).

Muitas enzimas desta classe têm sido detectadas nos últimos anos e, até o momento, 12 famílias já foram descritas: SPM (São Paulo MBL); GIM (German *Imipenemase*); SIM (Seul *Imipenemase*), KHM (Kyorin Health Science MBL), AIM (Australian *Imipenemase*), DIM (Dutch *Imipenemase*), SMB (*S. marcescens* MBL), TMB (Tripoli MBL), FIM (Florence *Imipenemase*), VIM (Verona *Imipenemase*), IMP (*Imipenemase*), NDM (New Delhi MBL). Desde suas descobertas, a grande maioria destas enzimas não se disseminou além de seus países de origem, possivelmente por serem de localização cromossômica. No entanto, IMP, VIM, e NDM já foram detectadas em grande número de países, e os genes que as codificam são localizadas em plasmídeos ou no cromossomo de diversas espécies de bacilos gram-negativos clinicamente relevantes (Queenan & Bush, 2007; Patel & Bonomo, 2013).

IMP-1 foi identificada pela primeira vez em 1993 em isolados de *S. marcescens* no Japão (Ito *et al.*, 1995). Após a primeira detecção, esta enzima foi identificada na Europa, Brasil e regiões da Ásia em diversas espécies de bacilos gram-negativos, incluindo *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae* (Bush and Jacoby, 2010). Atualmente, mais de 50 variantes de IMP foram identificadas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

VIM-1 foi identificada pela primeira vez em 1997 na Itália em um isolado de *P. aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999). Posteriormente, VIM-2 foi descoberta na França, também em *P. aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2000b). Atualmente, 46 variantes de VIM foram identificadas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

Inicialmente estas enzimas foram identificadas em bacilos gram-negativos não fermentadores, porém, a identificação em enterobactérias não é incomum (Patel & Bonomo).

O primeiro relato de NDM-1 ocorreu em 2008 na Índia, em um isolado de *K. pneumoniae* (Yong *et al.*, 2009). Após sua identificação inicial, estudos indicaram a propagação de NDM-1 e suas variantes em diversas regiões do mundo, sendo encontradas em todos os continentes (Bonnin *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2013; Göttig *et al.*, 2013; Lowe *et al.*, 2013; Lowman *et al.*, 2011; Nordmann *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2011a; Zou *et al.*, 2015).

No Brasil, o primeiro caso de NDM-1 foi detectado em 2013, na cidade de Porto Alegre em uma *Providencia rettgeri* e em *Enterobacter cloacae* (Carvalho-Assef *et al.*, 2013). Atualmente, outros estudos mostram a disseminação entre outras espécies como *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e inclusive entre não fermentadores como *A. baumannii* e *A. pittii* (Carneiro *et al.*, 2014; Carvalho-Assef *et al.*, 2014; Pillonetto *et al.*, 2014; Rozales *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015; Pagano *et al.*, 2015; Aires *et al.*, 2017).

Embora 17 variantes de NDM tenham sido caracterizadas, a NDM-1 é a variante de maior importância epidemiológica, sendo encontrada mundialmente em espécies de *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter* spp. (Khan *et al.*, 2017).

2.3.3 Carbapenemases de Classe D

As β -lactamases de classe D são também denominadas oxacilinases (OXAs) devido à elevada capacidade de hidrolisar cloxacilina, oxacilina e meticilina. Este grupo de enzimas caracteriza-se por não ser afetado por inibidores usuais de β -lactamases como o ácido clavulânico e tazobactam; porém, a atividade *in vitro* pode ser inibida por concentrações elevadas de NaCl (Naas & Nordmann, 1999).

A maioria das β -lactamases de classe D pertencem ao grupo 2d da classificação funcional de Bush. Entre as quatro classes moleculares propostas por Ambler, a classe D é a que apresenta maior diversidade genética e bioquímica e pode ser codificada por genes localizados no cromossomo em algumas espécies, mas também associados a elementos genéticos móveis (Evans & Amyes, 2014).

De um modo geral, as β -lactamases da classe D não hidrolisam cefalosporinas de espectro estendido e apresentam baixa atividade hidrolítica contra carbapenêmicos. Entretanto, a associação destas enzimas a outros mecanismos de resistência, como diminuição de permeabilidade e alteração de PBPs, pode levar ao aumento de CIM para carbapenêmicos em alguns isolados (Patel & Bonomo, 2013).

A primeira OXA- β -lactamase com atividade de carbapenemase foi descrita em 1993, por Paton e colaboradores. A enzima, nomeada OXA-23, foi detectada em *A. baumannii* resistente a imipenem, cefalosporinas e penicilinas, isolado na Escócia em 1985. A exceção de um isolado de *Proteus mirabilis* identificado na França em 2002, esta enzima foi caracterizada exclusivamente em plasmídeos e cromossomo de espécies de *Acinetobacter* (Mugnier *et al.*, 2010; Bonnet *et al.*, 2002).

Isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 foram identificados mundialmente, inclusive no Brasil, frequentemente associados como causadores de surtos (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2005; Turton *et al.*, 2005). A OXA-23 compartilha apenas 60% de identidade com um segundo grupo de oxacilinasas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, que é constituído por OXA-24/40, OXA-25 e OXA-26. Estas enzimas diferem entre si por poucas substituições de aminoácidos (Bou *et al.*, 2000a; Bou *et al.*, 2000b; Héritier *et al.*, 2003; Naas *et al.*, 2005; Lolans *et al.*, 2006). Muitos casos de surtos envolvendo produtores de OXA-40 foram relatados nos EUA e a persistência durante uma década de um clone de *A. baumannii* produtor de OXA-40 foi demonstrado em Portugal (Da Silva *et al.*, Lopez-Otsoa *et al.*, 2002). Os altos níveis de resistência observados em isolados produtores de OXA-23 e OXA-40 deve-se à combinação de mecanismos adicionais de resistência (Poirel *et al.*, 2007).

A exemplo da OXA-23 e demais oxacilinasas mencionadas acima, a grande maioria das enzimas do tipo OXA capazes de hidrolisar carbapenêmicos estão restritas às espécies de *Acinetobacter*, principalmente *Acinetobacter baumannii* (Queenan & Bush, 20017). No entanto, no início da década passada, a OXA-48 emergiu como determinante de resistência a carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*. Devido à importância epidemiológica desta enzima, ela será discutida com mais detalhes mais adiante.

Atualmente, além da OXA-48, podemos encontrar na literatura outras OXA-carbapenemases caracterizadas em enterobactérias. Entre elas, a OXA-372, que foi identificada em plasmídeo de *Citrobacter freundii* recuperado de planta de águas residuais hospitalares na Itália (Antonelli *et al.*, 2015). Esta enzima apresenta 43% de

identidade com a OXA-48 e ambas apresentam parâmetros cinéticos semelhantes para a hidrólise do imipenem.

Mais recentemente, a OXA-427 foi identificada em plasmídeo de *S. marcescens* de paciente hospitalizado na Bélgica e, subsequentemente, detectada em isolados clínicos de *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. rettgeri* (Bogaerts *et al.*, 2017). Esta enzima apresenta apenas 29% de similaridade com a OXA-48, e seu perfil hidrolítico inclui penicilinas, ceftazidima, aztreonam e ertapenem.

2.4 OXA-48

2.4.1 Origem da OXA-48

A origem da OXA-48 parece estar fortemente ligada à mobilização de genes cromossômicos presentes em algumas espécies de *Shewanella*. *Shewanella* spp. são bacilos gram-negativos, aeróbios facultativos, frequentemente encontrados na água e no ambiente (Poirel *et al.*, 2004a). Alguns representantes são considerados potenciais reservatórios de genes que codificam para β -lactamases de classe D que hidrolisam carbapenêmicos (Poirel *et al.*, 2010). No cromossomo de *Shewanella oneidensis*, por exemplo, é possível encontrar o gene *bla*_{OXA-54} que codifica enzima capaz de hidrolisar eficazmente o imipenem. Interessantemente, esta enzima compartilha 92% de similaridade com a OXA-48 (Poirel *et al.*, 2004a).

Em estudo realizado por Zong (2012), a análise da sequência de aminoácidos de um isolado de *Shewanella xiamenensis* recuperado de material clínico na China, identificou a presença de dois genes, denominados *bla*_{OXA48b} e *bla*_{OXA-199}. As enzimas codificadas por estes genes diferem da OXA-48 em quatro e cinco aminoácidos, respectivamente. Concomitantemente a este estudo, identificou-se na Índia a sequência de *bla*_{OXA-181} em um isolado de *S. xiamenensis* (Potron *et al.*, 2011d). Além destes achados, as sequências de *bla*_{OXA-204} e *bla*_{OXA-416} também foram identificadas em *S. xiamenensis*.

Recentemente, Tação e colaboradores (2017) realizaram um estudo de investigação da presença de genes relacionados a *bla*_{OXA-48} em genomas *Shewanella*. Os resultados encontrados na análise filogenética sustentam a hipótese da ligação destes organismos à origem de OXA-48 e suas derivadas. Contudo, os mecanismos de mobilização destes genes para outras espécies de bacilos gram-negativos ainda não estão

esclarecidos. Poirel e colaboradores (2012a) sugerem que sequências de inserção teriam mobilizado genes localizados no cromossomo para plasmídeos, os quais se disseminaram em espécies clinicamente relevantes como *K. pneumoniae* e *E. coli*. Assim, a disseminação de OXA-48 e outras oxacilinas pode ser resultado de uma ampla troca inter-espécies.

A figura 2 ilustra a similaridade entre a sequência de aminoácidos de OXA-48 e aquelas de outras oxacilinas encontradas em espécies de *Shewanella* spp.

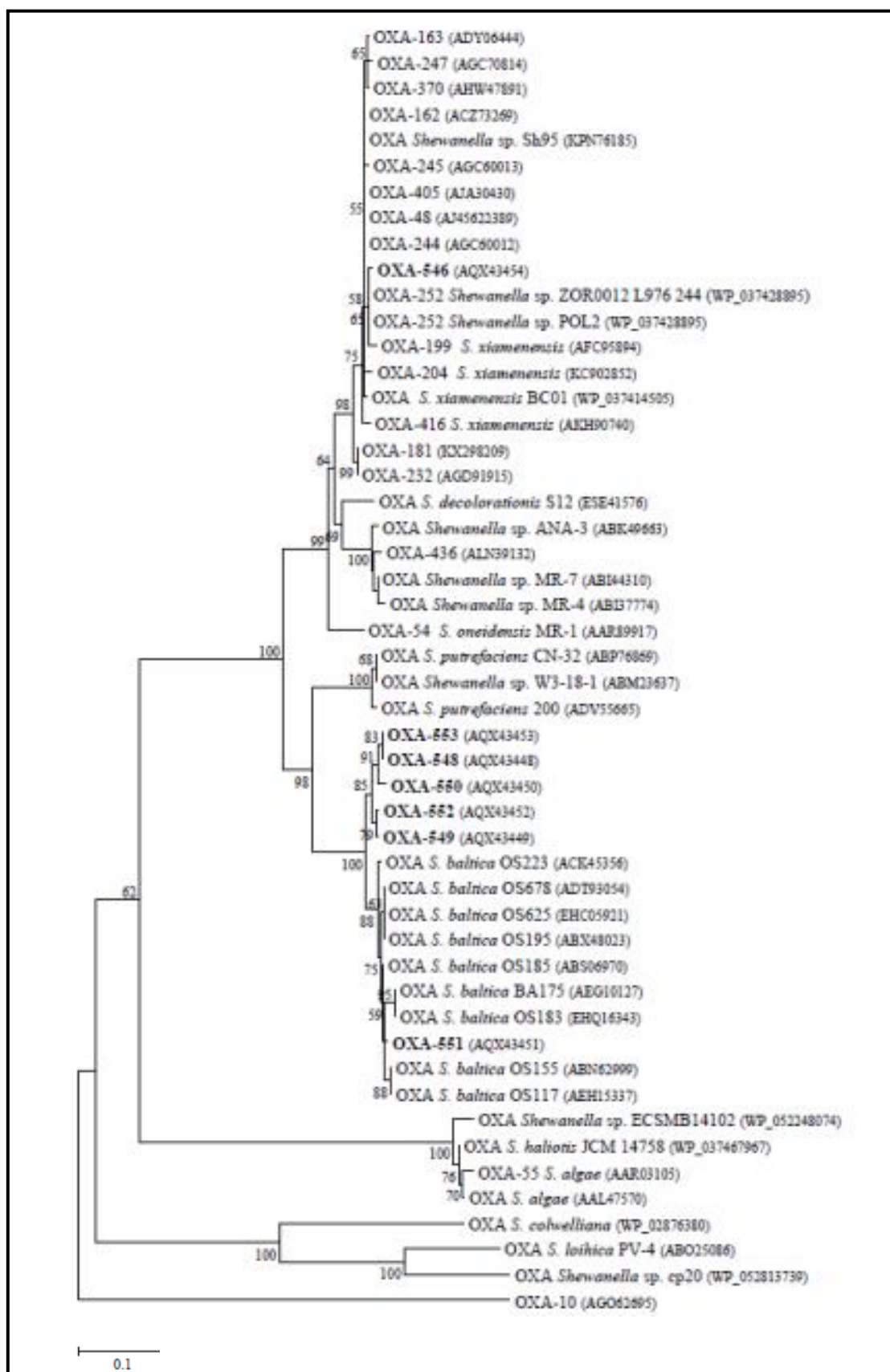


Figura 2. Árvore filogenética de similaridade entre seqüências de aminoácidos de enzimas da família OXA-48 e de outras OXAs codificadas por genes encontrados no cromossomo de *Shewanella* sp. Reproduzido de Tacão *et al.*, 2017.

2.4.2 Aspectos gerais

Em 2001, foi isolado em Istambul- Turquia, uma *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiplos fármacos, incluindo carbapenêmicos. Neste isolado, uma nova OXA-carbapenemase foi identificada e denominada OXA-48. Diferentemente da maioria da oxacilinases, que estão associadas a integrons de classe 1, o gene *bla*_{OXA-48} foi identificado localizado em um plasmídeo, compartilhando menos de 40% de identidade com outras OXAs anteriormente descrita (Poirel *et al.*, 2004a, Poirel *et al.*, 2004b).

A análise de cinética enzimática de OXA-48 mostrou que ela hidrolisa muito eficientemente penicilinas e apresenta baixo nível de atividade contra os carbapenêmicos, com uma atividade muito maior para imipenem, sendo considerada a enzima de classe D com maior atividade catalítica conhecida para este fármaco. Com relação as cefalosporinas de espectro estendido, a OXA-48 caracteriza-se por não hidrolisar ceftazidima e cefepime, mas hidrolisar fracamente cefotaxima (Poirel *et al.*, 2004b).

A análise da estrutura cristalina de OXA-48 realizada por Docquier e colaboradores (2009) revelou que esta β -lactamase possui um mecanismo diferente para hidrólise de carbapenêmicos quando comparada a outras OXAs-carbapenemases. Em contraste com a estrutura cristalina de OXA-24, a estrutura de OXA-48 foi semelhante a OXA-10, uma oxacilinase desprovida de atividade carbapenemase, indicando que a atividade para carbapenêmicos poderia estar associada a mudanças sutis na região do sítio ativo. Outro aspecto importante é que a fenda do sítio ativo de OXA-48 diferencia-se da encontrada em OXA-24 em forma, dimensão e distribuição de cargas. Neste estudo, os resultados das análises da dinâmica molecular encontrados apontaram para a relevância funcional de resíduos localizados no *loop* β 5- β 6 na atividade de carbapenemase de OXA-48.

Em 2011, o mesmo grupo de pesquisadores (De Luca *et al.*, 2011) realizou um estudo para investigar a importância do *loop* β 5- β 6 na atividade carbapenemase de OXA-23, OXA-24 e OXA-48. A partir da estrutura de OXA-10, os pesquisadores construíram modelos híbridos que continham o *loop* β 5- β 6 encontrado nas três oxacilinases investigadas e observaram que as propriedades hidrolíticas foram significativamente alteradas. Os híbridos adquiriram atividade significativa para imipenem, enquanto a capacidade de hidrolisar outros substratos, como penicilinas e cefalosporinas, não foi

alterada. Os dados encontrados neste estudo demonstram claramente o papel crítico dos resíduos do *loop* β 5- β 6 para atividade de carbapenemase destas enzimas.

2.4.3 Epidemiologia

Após a primeira descrição em 2004 (Poirel *et al.*, 2004b), isolados produtores de OXA-48 foram relatados como fonte de surtos nosocomiais na Turquia e identificados em países do Sul da Europa e África (Carrër *et al.*, 2008b; Carrër *et al.*, 2010; Cuzon *et al.*, 2011; Voulgari *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2013; Loucif *et al.*, 2016). Atualmente, esta enzima já foi identificada mundialmente e em diversos membros de importância clínica da família *Enterobacteriaceae*, conforme descrito na Tabela 2.

Embora a grande maioria das descrições relacione a OXA-48 a isolados clínicos de enterobactérias, estudos de detecção desta enzima em espécie de não fermentadores, como o *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, e em isolados recuperados de amostras ambientais e de animais também foram publicados (Potron *et al.*, 2011a; Al Bayssari *et al.*, 2014; Mathlouthi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Borah *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017; Piedra-Carrasco *et al.*, 2017).

Tabela 2. *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 e seus países de identificação.

País	Organismos descritos	Referência
África do Sul	<i>K. pneumoniae</i>	Poirel <i>et al.</i> , 2012b.
Alemanha	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	Pfeifer <i>et al.</i> , 2012.
Arábia Saudita	<i>K. pneumoniae</i>	Alotaibi <i>et al.</i> , 2017.
Argélia	<i>K. pneumoniae</i> <i>Providencia rettgeri</i>	Cuzon <i>et al.</i> , 2015.

Tabela 2. Continuação

País	Organismos descritos	Referência
Bélgica	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	Glupczynski <i>et al.</i> , 2012; Huang <i>et al.</i> , 2013.
China	<i>K. pneumoniae</i>	Guo <i>et al.</i> , 2016.
Egito	<i>K. pneumoniae</i>	Carrër <i>et al.</i> , 2010.
Eslovênia	<i>K. pneumoniae</i>	Pirš <i>et al.</i> , 2011.
Espanha	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. coli</i>	Pitart <i>et al.</i> , 2011. Fernández <i>et al.</i> , 2015. Ortega <i>et al.</i> , 2017.
EUA	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella ozaenae</i> <i>E. coli</i>	Lyman <i>et al.</i> , 2015.
França	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. coli</i>	Cuzon <i>et al.</i> , 2011; Poirel <i>et al.</i> , 2012a.
Grécia	<i>K. pneumoniae</i>	Voulgari <i>et al.</i> , 2013.
Holanda	<i>K. pneumoniae</i>	Potron <i>et al.</i> , 2011b.
Índia	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	Khajuria <i>et al.</i> , 2014.
Irã	<i>E. coli</i>	Hojabri <i>et al.</i> , 2017.
Irlanda	<i>K. pneumoniae</i>	O'Brien <i>et al.</i> , 2011.

Tabela 2. *Continuação*

País	Organismos descritos	Referência
Israel	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>K. oxytoca</i>	Goren <i>et al.</i> , 2010; Adler <i>et al.</i> , 2011; Chen <i>et al.</i> , 2015.
Itália	<i>E. coli</i>	Giani <i>et al.</i> , 2012.
Líbia	<i>K. pneumoniae</i>	Kraiem <i>et al.</i> , 2015.
Marrocos	<i>K. pneumoniae</i> <i>S. marcescens</i> <i>E. cloacae</i> <i>K. oxytoca</i>	Poirel <i>et al.</i> , 2012a.
Reino Unido	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	Thomas <i>et al.</i> , 2013.
Rússia	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Fursova <i>et al.</i> , 2015.
Senegal	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	Moquet <i>et al.</i> , 2011.
Suíça	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Dortet <i>et al.</i> , 2017.
Sultanato de Omã	<i>K. pneumoniae</i>	Dortet <i>et al.</i> , 2012.
Tailândia	<i>K. pneumoniae</i>	Lunha <i>et al.</i> , 2016.
Tunísia	<i>K. pneumoniae</i>	Saïdani <i>et al.</i> , 2012.

Tabela 2. *Continuação*

País	Organismos descritos	Referência
Turquia	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>C. freundii</i> <i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i> <i>Providencia rettgeri</i>	Nazic <i>et al.</i> , 2005. Carrer <i>et al.</i> , 2010; Aktas <i>et al.</i> , 2012.
Twain	<i>E. coli</i>	Jao <i>et al.</i> , 2016.
Vietnã	<i>K. pneumoniae</i>	Tada <i>et al.</i> , 2017.

Desde a publicação do primeiro relato em 2004, variantes de OXA-48 foram descritas em enterobactérias de diversas regiões do mundo. Até o momento, 20 derivadas de OXA-48 tiveram suas sequências depositadas no banco de dados de β -Lactamases do NCBI (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/beta_lactamases/Allele.tab acesso em 10 de setembro 2017), as quais diferem pela variação de um pequeno número de aminoácidos. Na Tabela 3 estão apresentadas enzimas derivadas de OXA-48 que possuem informações adicionais disponíveis e na Figura 3 está representada a distribuição geográfica dos países de primeiro relato destas enzimas.

A maioria das enzimas relacionadas a OXA-48 são codificadas por genes localizados em plasmídeos e, a exceção de algumas representantes, apresentam perfil hidrolítico bastante semelhante ao da OXA-48 (Poirel *et al.*, 2004b).

Quanto à epidemiologia, embora a OXA-48 já tenha sido descrita mundialmente, a disseminação de suas derivadas parece não apresentar o mesmo nível de expansão. A exceção da OXA-181 que, foi detectada *K. pneumoniae* Índia, Holanda, Nova Zelândia e Sultanato de Omã, em outras espécies de enterobactérias, como *Citrobacter freundii* e *Providencia rettgeri* (França) e em *E. coli* (Índia) (Castanheira *et al.*, 2011; Kalpoe *et al.*, 2011; Potron *et al.*, 2011c; Williamson *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2012a). Relatos de enterobactérias produtores de *bla*_{OXA-181} associado a outros genes, como *bla*_{NDM-1} e *bla*_{VIM-5}, também já foram publicados (Castanheira *et al.*, 2011; Potron

et al., 2011c). Sabendo que a Índia parece ser o reservatório principal dos produtores de NDM e que este gene está disseminado mundialmente, a propagação de OXA-181 além do continente indiano pode estar associada a propagação de isolados carreadores de *bla*_{NDM} (Nordmann *et al.*, 2011).

Tabela 3. Primeiras descrições de variantes de OXA-48 e suas características.

Variante	Localização	Organismos descritos	País	Similaridade genética com OXA-48	Perfil de hidrólise	Referência
OXA-181	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i>	Índia	Difere pela substituição de quatro aminoácidos	Similar a OXA-48	Potron <i>et al.</i> , 2011c.
OXA-232	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Índia	Difere por cinco aminoácidos Difere da OXA-181 por um aminoácido	Similar a OXA-48, porém com menor capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e atividade maior para penicilinas	Potron <i>et al.</i> , 2013a.
OXA-162	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i>	Alemanha	Difere pela substituição de um aminoácido	Similar a OXA-48	Pfeifer <i>et al.</i> , 2012.
OXA-163	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i>	Argentina	Difere pela deleção de quatro aminoácidos	Hidrolisa cefalosporinas de espectro estendido e não hidrolisa carbapenêmicos	Poirel <i>et al.</i> , 2011b.

Tabela 3. Continuação

Variante	Localização	Organismos descritos	País	Similaridade genética com OXA-48	Perfil de hidrólise	Referência
OXA-247	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i>	Argentina	Difere da OXA-163 pela substituição de dois aminoácidos	NA	Gomez <i>et al.</i> , 2013.
OXA-204	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i>	Tunísia	Difere pela substituição de dois aminoácidos	Similar a OXA-48	Potron <i>et al.</i> , 2013b.
OXA-244	Plasmídeo Cromossomo	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	Espanha -	Difere pela substituição de um aminoácido	NA	Oteo <i>et al.</i> , 2012; Potron <i>et al.</i> , 2016
OXA-245	Plasmídeo	<i>K. pneumoniae</i>	Espanha	Difere pela substituição de um aminoácido	NA	Oteo <i>et al.</i> , 2012.
OXA-405	Plasmídeo	<i>S. marcescens</i>	França	Difere pela deleção de quatro aminoácidos	Hidrolisa penicilinas, cefotaxima, cefalotina e não hidrolisa carbapenêmicos	Dortet <i>et al.</i> , 2015b.

Tabela 3. Continuação

Variante	Localização	Organismos descritos	País	Similaridade genética com OXA-48	Perfil de hidrólise	Referência
OXA-370	Plasmídeo	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Brasil	Difere pela substituição de um aminoácido	NA	Sampaio <i>et al.</i> , 2014.
OXA-416	Cromossomo	<i>Shewanella xiamenensis</i>	Itália	Difere pela substituição de três aminoácidos	Similar a OXA-48	Antonelli <i>et al.</i> , 2015.
OXA-199	Cromossomo	<i>Shewanella xiamenensis</i>	China	Difere por cinco nucleotídeos	NA	Zong, 2012.
OXA-48b	Cromossomo	<i>Shewanella xiamenensis</i>	China	Difere por quatro nucleotídeos	NA	Zong, 2012.

Abreviação: NA (Não Avaliada)

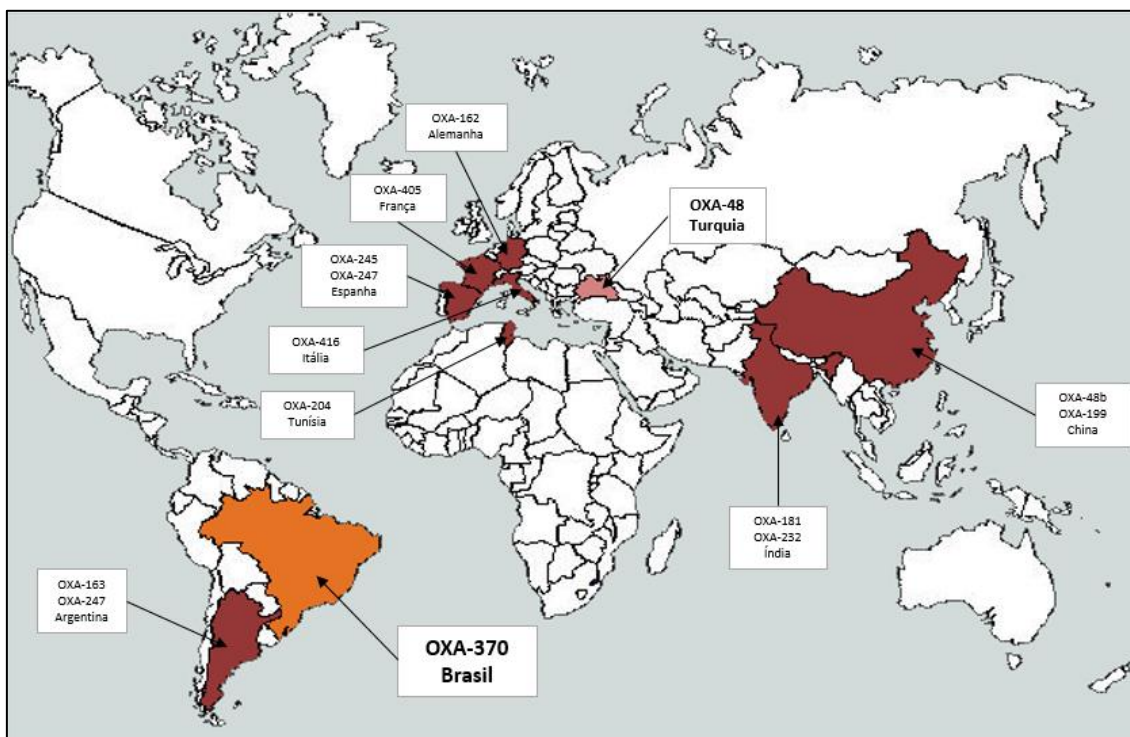


Figura 3. Distribuição geográfica dos países de primeiros relatos de OXA-48 e derivadas.

2.4.4 Plataforma genética de *bla*_{OXA-48}

O gene *bla*_{OXA-48} foi originalmente detectado em um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncL/M, à jusante da sequência de inserção *IS1999*, um elemento da família *IS4* relacionado a mobilização e expressão de genes de resistência a β -lactâmicos (Poirel *et al.*, 2004b; Carrère *et al.*, 2010). Posteriormente, foi demonstrado que *IS1999* compunha um transpóson composto denominado *Tn1999*, que é constituído por duas cópias de *IS1999* que flanqueiam o gene *bla*_{OXA-48} e está inserido dentro de um gene *tir*. A jusante de *bla*_{OXA-48}, encontra-se um gene *lysR* seguido por um fragmento truncado de um gene *acc*, os quais compartilham 98 e 100% de identidade com genes das mesmas famílias encontrados em *S. oneidensis* (Carrère *et al.*, 2010).

A primeira identificação de *IS1999* foi em isolados clínicos de *P. aeruginosa* na Tailândia (Girlich *et al.*, 2002). Nestes isolados, *IS1999* estava associada ao gene *bla*_{VEB-1} que codifica para ESBL. Em estudo de caracterização funcional desta estrutura, Aubert e colaboradores (2006) mostraram que uma das principais características da *IS1999* é a

inclusão de sequências de promotores fortes envolvidos na expressão de genes localizados à jusante, como encontrado na plataforma genética de *bla*_{OXA-48}.

Apesar de Tn1999 ser a plataforma classicamente relacionada a OXA-48, isoformas desta estrutura foram identificados em associação ao gene *bla*_{OXA-48}, porém são bem menos frequentemente relatadas.

O Tn1999.2 foi identificado em *K. pneumoniae* isoladas em Istambul e difere do Tn1999 pela inserção de uma *ISIR* (Carrër *et al.*, 2010). Acredita-se que a localização de *ISIR* à montante da *bla*_{OXA-48} proporcionou o aumento da expressão do gene. Curiosamente, isolados que abrigam a estrutura Tn1999.2 apresentam CIMs mais altas para carbapenêmicos, quando comparado aos isolados que abrigam a estrutura Tn1999. (Carrër *et al.*, 2010).

O Tn1999.3 foi identificado por Giani e colaboradores (2012) em uma *E. coli* isolada na Itália e apresenta estrutura semelhante ao do Tn1999.2. Porém, abriga uma segunda cópia de *ISIR*. Semelhante ao observado na estrutura de Tn1999.2, o gene de OXA-48 poderia ter vantagens de expressão com a inserção de *ISIR* à montante e a presença de duas cópias de *ISIR* poderiam também auxiliar na sua mobilização (Giani *et al.*, 2012).

O Tn1999.4 também está associado a isolados produtores de OXA-48. Esta estrutura foi identificada por Potron e colaboradores (Potron *et al.*, 2013) em um estudo que comparou geneticamente 107 isolados de enterobactérias produtoras de OXA-48 provenientes de diversos países. O Tn1999.4 é formado pelo Tn1999.2 interrompido por outro transpóson, o Tn2015, o qual é composto por *ISEcp1*, *bla*_{CTX-M-15} e um gene de transposase Tn2 truncado (Potron *et al.*, 2013c).

Recentemente, o gene *bla*_{OXA-48} foi encontrado na plataforma denominada Tn1999.5, uma variante do transpóson Tn1999.2 em que o gene *lysR* está truncado pelo elemento *ISKpn19* (Skalova *et al.*, 2017).

As estruturas que compõe a plataforma genética Tn19999 e estruturas que compõe suas isoformas estão representadas de forma esquemática na Figura 4.

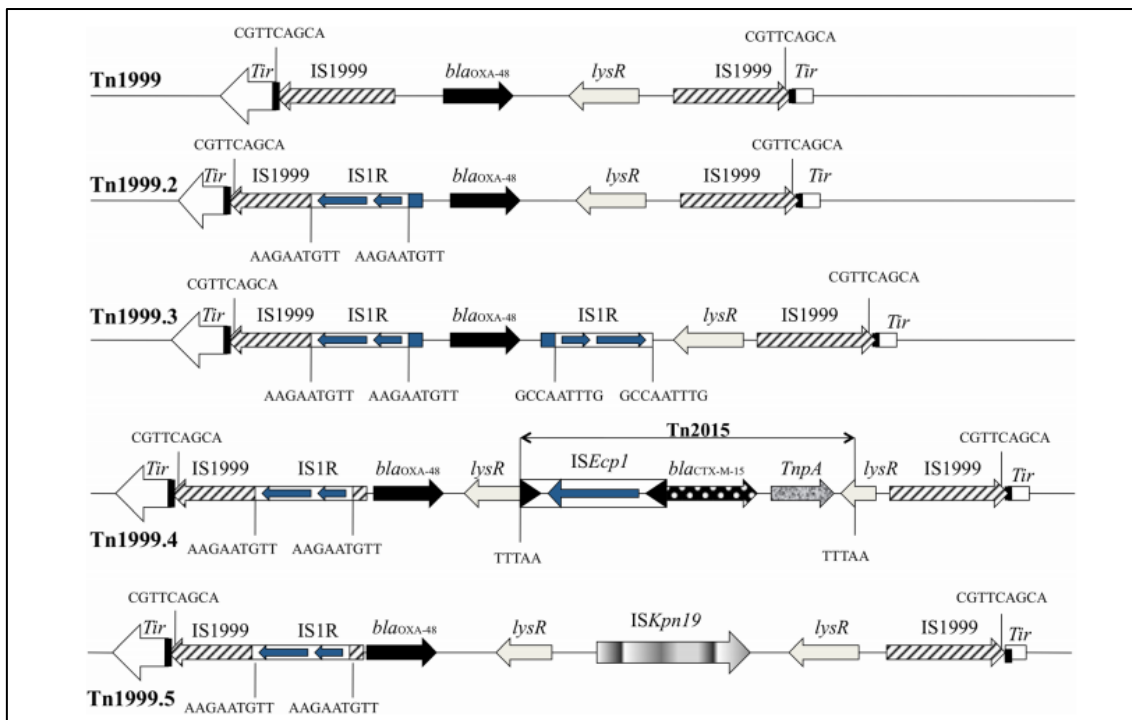


Figura 4. Estruturas da plataforma genética *Tn1999* e suas derivadas que abrigam OXA-48. Reproduzido de Mairi *et al.*, 2017.

A estrutura clássica *Tn1999* abrigada em plasmídeo IncL/M manteve-se conservada no ambiente genético da maioria das derivadas de OXA-48, exceto para algumas representantes.

No ambiente genético da OXA-163 e sua derivada, a OXA-247, as estruturas conhecidas que abrangem *bla*_{OXA-48} não foram encontradas. Ambos os genes foram identificados em plasmídeos não tipáveis e as sequências de inserção *ISEcpI* e uma variante de *IS4* foram os elementos identificados à montante e à jusante de ambos os genes (Poirel *et al.*, 2011b; Gomez *et al.*, 2013).

O gene que codifica OXA-181 foi caracterizada em um ambiente genético totalmente diferente dos relacionados a OXA-48 e sem qualquer característica de *IS1999*. *bla*_{OXA-181} foi localizado em plasmídeo do tipo ColE e a sequência de inserção *ISEcpI* foi identificada à montante do gene (Potron *et al.*, 2011c). Esta IS é amplamente responsável pela aquisição de genes ESBLs como *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY} (Poirel *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2007). Em *K. pneumoniae* isolada em Omã, o gene *bla*_{OXA-181} foi identificado associado à *ISEcpI*, compondo em um transpóson chamado *Tn2013* (Potron *et al.*, 2011c). A mesma associação entre *ISEcpI* e *bla*_{OXA-181} foi encontrada em outros

produtores de OXA-181 identificados em estudo conduzido por Poirel (2012). Um ambiente genético similar ao da OXA-181 foi descrito para a sua derivada, OXA-232, com exceção da sequência de inserção *ISEcp1*, que foi quase totalmente eliminada (Potron *et al.*, 2013).

A plataforma genética originalmente descrita para OXA-204 também é distinta a da OXA-48, porém, são observadas estruturas similares as descritas para OXA-181. O gene *bla_{OXA-204}* foi originalmente localizado em um plasmídeo do tipo IncA/C, responsáveis pela disseminação de diversos genes de resistência, em particular *bla_{CMY}* (Call *et al.*, 2010). A presença da sequência de inserção *ISEcp1* foi observada à montante do gene *bla_{OXA-204}*, contudo, uma análise detalhada mostrou que a *ISEcp1* foi truncada por outra sequência de inserção denominada *ISKpn15*. Este conjunto de estruturas caracterizam o transpóson denominado Tn2016 (Potron *et al.*, 2013a).

O gene que codifica OXA-370 também foi caracterizado em uma plataforma genética distinta daquela observada para OXA-48. As estruturas que abrangem este gene serão melhor discutidas mais adiante.

2.4.5 Plasmídeos envolvidos na disseminação de OXA-48

A disseminação plasmideal de OXA-48 e suas variantes está relacionada a uma gama estreita de plasmídeos, o que poderia explicar a dispersão prioritária deste gene entre isolados de enterobactérias (Poirel *et al.*, 2012b).

Em estudo publicado em 2012b, Poirel e colaboradores caracterizaram a estrutura de plasmídeos portadores do gene *bla_{OXA-48}* encontrados em diferentes enterobactérias, diferentes clones e diferentes países, e revelaram que estes plasmídeos compartilhavam características muito semelhantes: a) eram auto-conjugativos e de tamanho muito similar (entre 60-70 kb); b) não apresentavam determinantes adicionais de resistência; e c) não eram tipáveis por PBRT. De acordo com Poirel, a coprodução de ESBLs observada em 80% dos produtores de OXA-48 deve-se, portanto, a aquisição de plasmídeos adicionais.

O gene *bla_{OXA-48}* já foi identificado em plasmídeos de grupos de incompatibilidade como IncF, IncA/C e IncL/M (Potron *et al.*, 2013c). Contudo, devido às características comuns encontradas em plasmídeos portadores deste gene, alguns autores sugerem que a epidemia de OXA-48 está relacionada à disseminação bem sucedida de um único tipo de

plasmídeo IncL/M, no qual o gene *bla*_{OXA-48} teria sido integrado através da aquisição do transpóson composto Tn1999 (Poirel *et al.*, 2012b).

Plasmídeos do tipo IncL/M são comuns em isolados clínicos e ambientais de enterobactérias e frequentemente identificados na origem da aquisição de uma variedade de genes de resistência, incluindo *bla*_{NDM-1} e *bla*_{CTX-M-3} (Carrër *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2012a; Poirel *et al.*, 2012b; Carattoli *et al.*, 2009; Bonnin *et al.*, 2013). Recentemente, Carattoli e colaboradores (2015) publicaram uma análise comparativa do sequenciamento completo de plasmídeos desta linhagem que os diferencia em duas linhagens genéticas, IncL e IncM. Esta nova análise classifica os plasmídeos carreadores de *bla*_{OXA-48} como pertencentes ao grupo IncL. Assim, os plasmídeos portadores de *bla*_{OXA-48} detectados em estudos anteriores e caracterizados como IncL/M poderão ser redefinidos como pertencentes ao tipo IncL.

A Figura 5 ilustra a similaridade entre IncL e IncM e a nova classificação proposta por Carattoli para *bla*_{OXA-48} e outros determinantes de resistência.

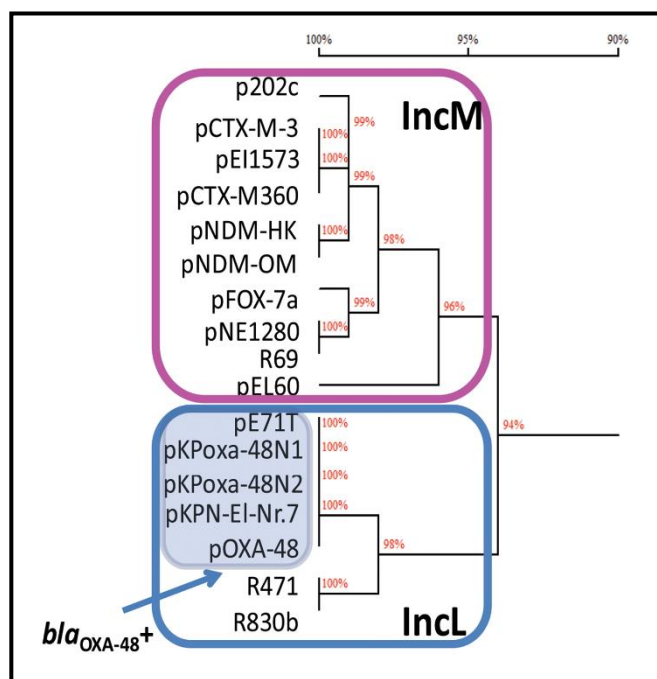


Figura 5. Árvore de similaridade entre os genomas de IncL e IncM e agrupamento de alguns determinantes de resistência. Reproduzido de Carattoli *et al.*, 2015.

2.4.6 Epidemiologia molecular

O gene *bla*_{OXA-48} já foi identificado em diferentes espécies e em isolados da mesma espécie apresentando diferentes perfis de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e ou *sequence types* (ST), indicando elevado nível de transferência entre e intra-espécies. Além de casos esporádicos, podemos encontrar na literatura relatos de surtos causados por produtores de OXA-48.

Assim como a primeira descrição, o primeiro grande surto descrito de OXA-48 ocorreu na Turquia, no período de 2006-2007. Carrër e colaboradores (2008b) investigaram 39 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital de Istambul e observaram a disseminação de dois clones. Os isolados envolvidos no surto não apresentaram relação clonal com o isolado de *K. pneumoniae* da primeira descrição, indicando a disseminação concomitante de vários clones de *K. pneumoniae* produtores de OXA-48 em Istambul.

Em países europeus, surtos e casos esporádicos de enterobactérias produtoras de OXA-48 estão associados a diferentes STs. Isolados de *K. pneumoniae* produtores de OXA-48 pertencentes ao ST395 foram associados a surtos na França e na Holanda, e também foram identificados no Marrocos (Potron *et al.*, 2011b; Cuzon *et al.*, 2011). A análise do PFGE de isolados representantes das três regiões geográficas citadas revelou que os isolados eram estreitamente relacionados, caracterizando a disseminação de um mesmo clone. Os isolados identificados possuíam outros determinantes de resistência como os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV-1}, como relatado em muitos produtores de OXA-48.

Na Espanha, *K. pneumoniae* produtoras de OXA-48 e pertencentes ST101 foram associadas a dois surtos (Pitart *et al.*, 2011). A ST101 é variante da ST258 que, atualmente, é amplamente identificada em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC. *K. pneumoniae* pertencentes ao ST101 também foram relacionadas a duas pandemias de OXA-48 na Argélia no período de 2014-2015 (Loucif *et al.*, 2016)

Outras STs já foram descritas como envolvidas na disseminação de *bla*_{OXA-48}. A ST353 foi associada a um surto de *K. pneumoniae* produtoras de OXA-48 em Londres e a ST221 na Irlanda. Isolados de *K. pneumoniae* coprodutoras de OXA-48 e KPC usualmente apresentam ST14 e ST11. Na Grécia, um surto de OXA-48 foi associado ao ST11 (Poirel *et al.*, 2004b; Woodford *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2012; Voulgari *et al.*,

2012). Nos EUA, os primeiros casos clínicos de produtores de OXA-48 foram associados ao ST199 e ao ST43 (Mathers *et al.*, 2013).

Apesar da disseminação de OXA-48 ocorrer predominante em *K. pneumoniae*, relatos envolvendo outras espécies de enterobactérias pertencentes a STs epidêmicos já foram descritos. Em 2011, Poirel e colaboradores (Poirel *et al.*, 2011c) caracterizaram três isolados de *E. coli* positivos para OXA-48, oriundos da Turquia, Israel e Senegal, pertencente ao ST38. A análise do PFGE revelou que os três isolados eram clonalmente relacionados, o que indica que uma mesma linhagem de *E. coli* produtora de OXA-48 está circulando em pelo menos três regiões geográficas distintas. Em estudos prévios, isolados de *E. coli* ST38 haviam sido associados a disseminação de genes *bla*_{CTX-M-14} na China e *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-9} no Japão.

Potron e colaboradores, reforçaram os achados de *E. coli* produtoras de OXA-48 pertencentes ao ST38. Além disso, encontraram em sua investigação isolados de *E. coli* positivos para OXA-48 pertencentes ao grupo filogenético D/B2, que incluem principalmente cepas virulentas (Potron *et al.*, 2013).

Poucos são os estudos que relatam a presença de OXA-48 em isolados do complexo *E. cloacae*. Entretanto, os dados obtidos até agora indicam que a disseminação do gene nestas espécies está associada a diferentes clones (Poirel *et al.*, 2011d; Potron *et al.*, 2013).

2.4.7 OXA-370

A primeira detecção de β -lactamase relacionada a OXA-48 no Brasil ocorreu em 2013, com a identificação da variante OXA-370. Sampaio e colaboradores (2014) identificaram a presença do gene *bla*_{OXA-370} em um isolado do Complexo *Enterobacter cloacae* recuperado de swab retal de um paciente hospitalizado na cidade de Porto Alegre, durante um estudo de monitoramento de enterobactérias produtoras de carbapenemase. O isolado apresentava reduzida sensibilidade a imipenem e resistência a ertapenem, cefalosporinas e aztreonam. A análise da sequência dos genes mostrou que *bla*_{OXA-370} diferia de *bla*_{OXA-48} por três nucleotídeos, porém somente a substituição T 634G e C 635- A resultou na substituição de um aminoácido, S220E. A análise plasmideal evidenciou que *bla*_{OXA-370} localizava-se em um plasmídeo conjugativo do tipo IncF de

aproximadamente 150 kb. Além do gene *bla*_{OXA-370}, o isolado carregava também os genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M-8}.

Diferentemente da plataforma genética Tn1999 comumente relacionada a *bla*_{OXA-48}, o gene *bla*_{OXA-370} encontrava-se flanqueado à montante por um gene *tnpA*, da família Tn3, truncado na porção 3' por uma sequência de inserção semelhante à IS5075 e flanqueado à jusante por um gene *tnpA* da família Tn4, truncado na porção 5' por uma sequência de inserção do tipo IS15.

O perfil hidrolítico da enzima não foi caracterizado neste estudo. Porém, a comparação entre os resultados de CIMs do transformante e do isolado selvagem sugeriram que a nova enzima parecia não hidrolisar carbapenêmicos e que a presença de *bla*_{CTX-M-8} poderia estar superestimando a CIMs das cefalosporinas no isolado selvagem, visto que as CIMs para ceftazidima, cefotaxima e cefepima foram reduzidas na presença do clavulanato. Apenas a CIM de piperacilina manteve-se elevada no transformante e no isolado selvagem, mesmo na presença de inibidor de β -lactamase, o que é compatível com o perfil de OXA-48.

Posteriormente a primeira descrição, Pereira e colaboradores (2015) descreveram a presença de OXA-370 em *E. aerogenes* e *E. cloacae* e a disseminação clonal de *K. pneumoniae* produtoras de OXA-370 recuperados de materiais clínicos de pacientes de cinco hospitais do Rio de Janeiro, durante o período de 2013 a 2014. A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* e os isolados de *Enterobacter* spp. avaliados no estudo apresentaram resistência a β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas e aztreonam. Além do gene *bla*_{OXA-370}, os genes *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-M-15} foram detectados entre estes isolados, diferindo dos genes de ESBLs associados ao plasmídeo do primeiro relato de OXA-370.

Quanto à epidemiologia molecular, a análise por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) identificou a presença de ST1041 e ST16 entre os isolados de *K. pneumoniae*. A sequência correspondente ao ST1041 já havia sido identificada em outros isolados de *K. pneumoniae* do Rio de Janeiro em 2012. A sequência correspondente ao ST16, por sua vez, foi associada à disseminação de NDM no Canadá e CTX-M-15 em Taiwan, Copenhague e Dinamarca. Além disso, o ST16 foi relacionada a *K. pneumoniae* produtora de OXA-48 que causou surtos em dois hospitais de diferentes regiões da Espanha. No Brasil, o ST16 foi encontrado no Rio de Janeiro em *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de hemocultura no final da década passada.

A análise plasmideal realizada em seis isolados do estudo mostrou a presença de plasmídeos de diferentes tamanhos. Em um isolado de *K. pneumoniae* pertencente ao ST104, foi identificado um plasmídeo de aproximadamente 50kb, enquanto em dois isolados de *K. pneumoniae* pertencentes ao ST16 foram observados plasmídeos com tamanhos entre 25 e 117 kb. Em *E. cloacae*, o gene foi observado em um plasmídeo de aproximadamente 40kb e *E. aerogenes* em um plasmídeo de aproximadamente 150kb, similar em tamanho ao plasmídeo descrito no Rio Grande do Sul.

Subsequentemente a esta publicação, Aires e colaboradores (2016) publicaram dados que indicam que a OXA-370 estaria circulando no Rio Grande do Sul há pelo menos um ano antes de sua primeira detecção. Neste estudo, os autores caracterizaram um isolado de *K. pneumoniae* produtor de OXA-370 coletado no Rio Grande do Sul em maio de 2012. A análise plasmideal revelou que *bla*_{OXA-370} estava localizado em um plasmídeo de aproximadamente 57kb. Além de *bla*_{OXA-370}, o isolado continha os genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M-8}.

Aparentemente, o gene *bla*_{OXA-370} apresenta alta capacidade de mobilidade, visto que neste estudo os autores revelam que a OXA-370 foi identificada também em isolado de *Aeromonas punctata* recuperado de ambiente aquático no Rio de Janeiro. Ainda nesta publicação, Aires e colaboradores citam que o isolado de *K. pneumoniae* produtor de OXA-370 apresentou resultado negativo para o blue-carba, teste rápido para detecção de carbapenemases. Os autores atribuíram a sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos do produtor de OXA-370 à associação de diferentes mecanismos, como perda de porinas ou bombas de efluxo.

A análise por PFGE e MLST mostrou que o isolado de *K. pneumoniae* tinha padrão de bandas semelhante a dos isolados clonais de *K. pneumoniae* descritos por Pereira e colaboradores (2015) e que pertencia ao ST17. Os isolados pertencentes aos ST16 e ST17 são agrupados no mesmo complexo clonal designado CC16-17. Este estudo evidenciou a associação da disseminação de OXA-370 a isolados pertencentes ao complexo clonal CC16-17.

A mais recente publicação descrevendo isolados produtores de OXA-370 é de Rozáles e colaboradores (2017) que caracterizaram *Enterobacteriaceae* coprodutores de genes que codificam para carbapenemases. Dentre os isolados caracterizados no estudo, cinco isolados de *E. cloacae* produtores de *bla*_{NDM-1} e *bla*_{OXA-370} e um isolado de *K. pneumoniae* produtor de *bla*_{KPC-2} e *bla*_{OXA-370}, foram investigados quanto ao perfil plasmidial e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

No estudo, os transformantes que receberam somente *bla*_{OXA-370} apresentaram CIMs consideravelmente mais baixas para imipenem e meropenem, quando comparado aos isolados selvagens, o que reforça a hipótese de que esta variante não possui atividade de carbapenemase relevante. A análise dos plasmídeos dos isolados coprodutores de OXA-370 e NDM-1 ou KPC-2 mostrou que os diferentes genes estão abrigados em plasmídeos distintos, o que já havia sido observado em estudos prévios de avaliação de coprodutores de NDM-1 e OXA-181, e NDM-1 e OXA-232 (Balm *et al.*, 2013 e Both *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

Uma variante da OXA-48, a OXA-370, foi identificada em 2013 em Porto Alegre, Brasil. Entretanto, até o momento, são conhecidas poucas características desta enzima e qual a importância da presença deste gene em enterobactérias. Sabendo que a OXA-48 está disseminada mundialmente e é considerada importante mecanismo de resistência a carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*, é necessário o esclarecimento dos seguintes itens em relação a OXA-370: 1) a sua prevalência em isolados de *Enterobacteriaceae* do Rio Grande do Sul; 2) o impacto da presença de *bla*_{OXA-370} no perfil de sensibilidade aos β -lactâmicos, sobretudo carbapenêmicos; e 3) a caracterização do contexto genético em que *bla*_{OXA-370} está inserido. Este estudo pretende responder a estas questões.

4. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é caracterização de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores da β -lactamase OXA-370.

4.1 Específicos

- a) Avaliar prevalência de OXA-370 em enterobactérias com diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos;
- b) Conhecer o perfil de sensibilidade a β -lactâmicos, especialmente carbapenêmicos, de enterobactérias produtoras de OXA-370;
- c) Determinar a relação clonal entre os isolados produtores de OXA-370;
- d) Caracterizar o ambiente genético do gene *bla*_{OXA-370}.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo I

Dissemination of *bla*_{OXA-370} gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil

Publicado no *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*

5.2 Artigo II

Dissemination of *bla*_{OXA-370} is mediated by IncX plasmids and the Tn6435 transposon

Cibele Massotti Magagnin^{a,b}, Juliana Coutinho Campos^c, Darlan Augusto da Rocha^c,
Suely Carlos Ferreira Sampaio^d, Franciéli Pedrotti Rozáles^a, Afonso Luis Barth^a,
Alexandre Prehn Zavascki^{e,f,*} e Jorge Luiz Mello Sampaio^{c,g*}

^aLaboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) – Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^cUniversity of São Paulo, School of Pharmacy, Clinical Microbiology Laboratory, São Paulo, Brazil.

^dSanta Casa de São Paulo School of Medical Sciences, São Paulo, Brazil.

^e Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto, Porto Alegre, Brazil.

^fDepartment of Internal Medicine, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^g Fleury Medicine and Health, Microbiology Division, São Paulo, Brazil.

*J. L. M. Sampaio and A.P. Zavascki, both senior authors, contributed equally to this work and are joint corresponding authors

#Address correspondence to Jorge Sampaio, sampaio@usp.br

Telephone: 55-11-30914730

Fax: 55-11-38132197

#Address correspondence to Alexandre Prehn Zavascki, azavascki@hcpa.edu.br

Telephone: 55-51-33597749

Running title: Dissemination of *bla*_{OXA-370} by IncX plasmids.

Key-words: OXA-370, *Enterobacteriaceae*, plasmids, Brazil, **Tn6435**.

Abstract

In Enterobacteriaceae, the *bla*_{OXA-48}-like genes have been identified on plasmids in different regions of the world. The OXA-370 is a plasmid encoded OXA-48-like enzyme reported in two distinct regions of Brazil. Recently, we demonstrate that the *bla*_{OXA-370} gene is disseminated among several *Enterobacteriaceae* species and clones, indicating a high potential for dissemination. In this work we described for the first time the complete nucleotide sequence of six plasmids harboring the *bla*_{OXA-370} gene. Complete DNA sequencing using the Illumina platform and annotation of the plasmids showed that they belonged to incompatibility groups IncX and had in average 70 Kbp. The *bla*_{OXA-370} gene is located in a composite transposon containing four genes encoding transposases, named Tn6435. In this study, highly similar plasmids were detected in different *Enterobacteriaceae* genera.

Introduction

OXA-type β -lactamases are currently classified in three different subgroups based on their hydrolytic profile (1). The group 2df includes enzymes able to hydrolyze carbapenems, including OXA-48. OXA-370, a plasmid encoded OXA-48-like enzyme, differs from the former by a single amino acid substitution and was firstly reported from Porto Alegre, south of Brazil (2) and subsequently reported from Rio de Janeiro, on the southeast of Brazil (3). Dissemination of *bla*_{OXA-370} has been demonstrated to occur by clonal dissemination (3) but recently the detection of this gene was demonstrated in different enterobacterial species (4). However, there is no data regarding the complete sequence of plasmids harboring the *bla*_{OXA-370} gene so far. The aim of this work was to determine the complete nucleotide of plasmids involved in the dissemination of the *bla*_{OXA-370} gene among different species of *Enterobacteriaceae*.

Methods

Strains used in this study and species identification.

The *Enterobacteriaceae* isolates in this study are listed in Table 1. All strains were isolated from rectal swab samples in the same hospital in Porto Alegre, RS, Brazil. Identification to the species level was achieved by partial sequencing of the *rrs* gene (5). *Enterobacter* strains were also identified at the species level by partial sequencing of the *hsp60* gene, as previously described (6, 7), with modifications proposed by Campos et al. (8).

Plasmid extraction and transformation assays

Extraction of plasmid DNA from wild type strains was carried out as previously described by Birnboim and Doli (9), except that sodium acetate solution was refrigerated. Plasmid DNA solutions were used to transform electro competent *E. coli* TOP10 (Thermo) using *E. coli* Pulser (BioRad). Transformants were selected on LB agar containing ampicillin (100 mg/L). The presence of the *bla*_{OXA-370} gene in transformants was confirmed by PCR as previously described by Poirel et al. (10) with modifications proposed by Campos et al. (8). Plasmids were subsequently extracted from transformants grown in LB broth containing ampicillin (100 mg/L). The presence of plasmids was confirmed by 0.7% agarose gel electrophoresis applying 2.5 V/cm during 7 hours. *E. coli* 39R861 was used as a reference for estimating plasmid size (11). Plasmid bands were visualized under UV transillumination after GelRed (Biotium) staining.

Complete plasmid sequencing, assembly, annotation, and analysis.

Plasmid DNA samples were tagmented using the Nextera DNA sample preparation kit before fragments of ~2,000 bp were captured, purified, and sequenced using a MiSeq Reagent kit, v2 (500 cycles), in MiSeq system (Illumina). Sequences were assembled *de novo* in contigs using the SeqMan NGen program and subsequently aligned using SeqMan Pr, both in version 14.1.0 (DNAStar). Open reading frames (ORFs) were predicted and annotated using RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) (12). Manual curation and sequence similarity searches directed against the GenBank database were carried out using the ARTEMIS (13) genome browser and annotation tool. Insertion sequences were manually reviewed, directing searches against the IS Finder database (<https://www-is.biotoul.fr/>) (14). The full plasmid sequences were compared to those available at

GenBank using BLAST. Plasmid incompatibility group was evaluated using the Plasmid Finder software (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (15). Plasmid nucleotide sequences were aligned using BioEdit (16).

Nucleotide sequence accession numbers. The complete nucleotide sequences of the plasmids were deposited in GenBank under accession numbers X to Y.

Results

A total of six plasmids had the complete sequence determined. They were all circular and their GC content varied from 46.7% to 47.2%. All sequenced plasmids belonged to the IncX incompatibility group and had in average 70 Kbp (Table 1).

When the full nucleotide sequences of the 70 Kbp plasmids were analyzed using the PlasmidFinder 1.3 Server, no plasmid replicons were found even using a 50.0% threshold. Contrasting to this finding, annotation revealed the presence of genes encoding replication-associated proteins (*pir*, *bis*, *parA*, *hns* and *topB*), characteristically found in IncX plasmids. These genes are highlighted in blue color in Figure 1.

The largest IncX plasmid was designated p1368 and all others had their nucleotide sequences compared to it. Similarity indexes among them varied from 98 to 99%.

The p1368 plasmid has a *virB* operon encoding proteins of a type IV secretion apparatus implicated in conjugal transfer, but *virB3* and *virB7* are absent. It has *vapC-like* and *vapD-like* genes, known to encode a toxin-antitoxin system implicated in plasmid stability (17). The plasmid also has the *frmA*, *frmB* and *frmR* genes implicated in formaldehyde metabolism and tolerance (18). Concerning antimicrobial resistance genes, only genes encoding β -lactamases were found. The *bla*_{CTX-M-8} and the *bla*_{OXA-370} genes were found located 24 Kbp apart from each other (Figure 1).

The *bla*_{OXA-370} gene is located in a 3,710 bp in a composite transposon containing four genes encoding transposases; it is bracketed by IS26 at the 5' and *tnpA* gene at 3' (Figure 2). This transposon was registered as Tn6435 at Transposon Registry Database (<http://transposon.lstmed.ac.uk>). This mobile element is present in all IncX plasmids sequenced in this study and also an IncF plasmid p87F from *Enterobacter hormaechei*, which partial sequence was previously described by our group (GenBank accession KJ488493.1). When the Tn6435 complete nucleotide sequence was compared to other sequences available at GenBank, the maximum query cover was 63%.

When the p1368 nucleotide complete nucleotide sequence was compared to those available at GenBank, the maximum query cover (52%) and similarity index (99%) were observed with GenBank deposit CP011588.1, an isolate of *Enterobacter asburie* from human sample detected in Virginia, United States in 2008.

The IncX plasmids harboring *bla*_{OXA-370} differ from one another by insertion sequences. In the p1368 plasmid, isolated from *E. hormaechei* in October 2013, the *uvrB* gene is interrupted by the IS*Kpn24*, but this interruption is absent in the other five plasmids sequenced (Figure 1). The p1233 plasmid, isolated from *E. hormaechei* in October 2013, has a IS*Kpn40* between two genes encoding hypothetical proteins but this insertion is absent in all other plasmids. In plasmids p1032 and p1182, the IS5075, observed downstream the Tn6435 in p1368, p1233, p844 and p2048 is absent (Figure 1). Of note highly similar plasmids (99%) were detected in different *Enterobacteriaceae* genera.

Discussion

In this paper we described for the first time the complete nucleotide sequence of six plasmids harboring the *bla*_{OXA-370} gene. All of them belong to the IncX incompatibility group. IncX plasmids have been described to harbor different carbapenemase genes and to be responsible for the dissemination of these genes in different countries around the world, as is the case for *bla*_{NDM-1} (8, 19, 20), *bla*_{KPC-2} (21-24), *bla*_{KPC-3} (25) and *bla*_{KPC-4} and *bla*_{KPC-5} (26). More recently, these group of plasmids have been described to harbor the *mcr-1* gene (27, 28). There is a report of *bla*_{OXA-370} in plasmids of variable sizes in *K. pneumoniae* from Rio de Janeiro (3), but the complete nucleotide sequences and the incompatibility groups have not been reported.

All plasmid sequenced had a *virB* operon but lacked the *virB3* and *virB7*. The *virB* operon encodes a type IV secretion system (T4SS) that enables plasmid transfer through conjugation. The finding of highly similar plasmids in different PFGE clones and species suggests that these two genes are not essential for assembling of the T4SS and plasmid transfer.

The plasmids that we sequenced in this work were detected in isolates cultivated from rectal swabs during the period from August 2013 to February 2014. In a six month period we observed various occurrence of insertions sequences in the same *K. pneumoniae* and *E. hormaechei* clonal groups Kp1 and Eh1. These findings suggest a high frequency of genetic events in a plasmid in short period of time.

We found that the same Tn6435 was present in plasmids pertaining to IncX and IncF incompatibility groups. This finding evidences the capacity of this transposon to be transferred from one plasmid to another.

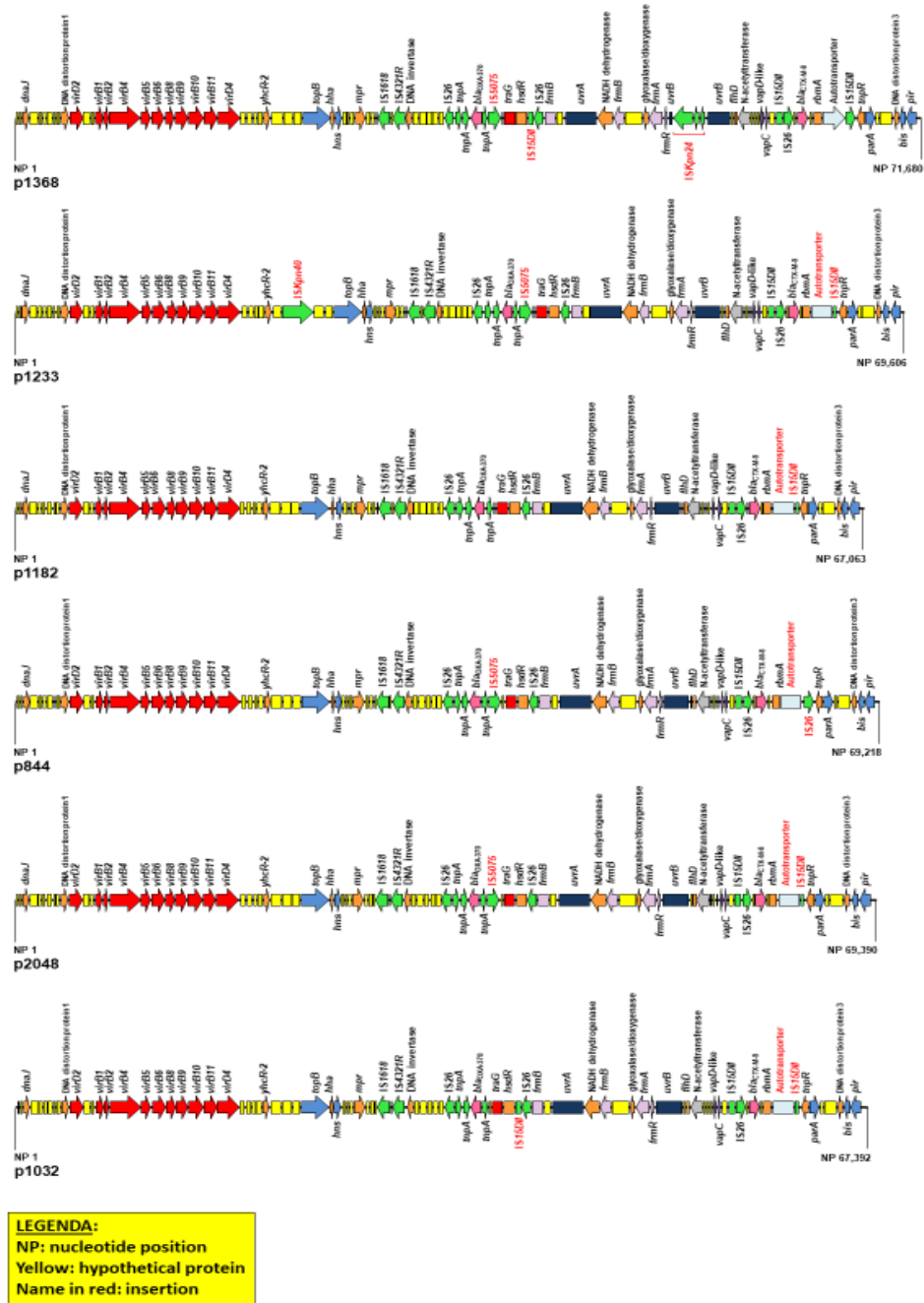
The complete sequence of IncX plasmids containing the *bla*_{OXA-370} gene showed that *bla*_{CTX-M-8} was also present. Considering that OXA-370 is weak carbapenemase that is not active against third and fourth generation cephalosporins (2), the presence of the *bla*_{CTX-M-8} may facilitate the dissemination of clones harboring the IncX plasmids we sequenced.

In summary, we demonstrate that the *bla*_{OXA-370} gene is disseminated among *Enterobacteriaceae* both by plasmid transfer and mobilization by a newly describe transposon here in designated Tn6435.

Table 1. OXA-370-producing *Enterobacteriaceae* isolates and plasmids information.

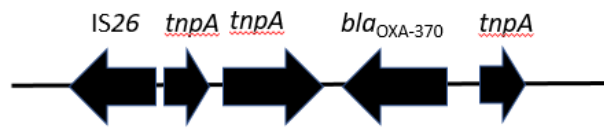
WT strain	Species	Date	PFGE Clone	Plasmid	Plasmid size (bp)	GC (%) content	Number of ORFs
844	<i>K. pneumoniae</i>	Aug/2013	Kp1	p844	69,218	46.8	94
1032	<i>K. pneumoniae</i>	Oct/2013	Kp2	p1032	67,392	46.8	94
1182	<i>K. pneumoniae</i>	Oct/2013	Kp2	p1182	67,063	46.7	93
1233	<i>E. hormaechei</i>	Oct/2013	Eh1	p1233	69,606	46.9	95
1368	<i>E. hormaechei</i>	Nov/2013	Eh1	p1368	71,680	47.2	100
2048	<i>K. pneumoniae</i>	Feb/2014	Kp2	p2048	68,390	46.8	94

Figure 1.



Comparison of sequence of plasmids harboring the blaOXA-370 gene

Figure 2.



Schematic map of the transposon Tn6435

References

1. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969-76.
2. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochewis LC, Barth AL, Zavascki AP. 2014. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3566-7.
3. Pereira PS, Borghi M, de Araujo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. 2015. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4453-6.
4. Magagnin CM, Rozales FP, Antochewis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, Sampaio JM, Zavascki AP. 2017. Dissemination of *bla*_{OXA-370} gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* doi:10.1007/s10096-017-3012-x.
5. M M. 2004. Broad-range PCR for detection and identification of bacteria., p 379-390. *In* D P (ed), *Molecular microbiology diagnostic principles and practice*. American Society for Microbiology, Washington DC.
6. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Pierard D, Ziesing S, Heesemann J, Roggenkamp A, Schleifer KH. 2005. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. *J Clin Microbiol* 43:3297-303.
7. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69:5306-18.
8. Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco BM, Magagnin CM, Leiroz LK, de Oliveira TG, de Faria-Junior C, Cerdeira LT, Barth AL, Sampaio SC, Zavascki AP, Poirel L, Sampaio JL. 2015. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7387-95.
9. Birnboim HC. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-55.
10. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119-23.
11. Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1:417-20.
12. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.

13. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28:464-9.
14. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34:D32-6.
15. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Moller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895-903.
16. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41.
17. Pullinger GD, Lax AJ. 1992. A *Salmonella dublin* virulence plasmid *locus* that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Mol Microbiol* 6:1631-43.
18. Hibi M, Sonoki T, Mori H. 2005. Functional coupling between vanillate-O-demethylase and formaldehyde detoxification pathway. *FEMS Microbiol Lett* 253:237-42.
19. Ho PL, Li Z, Lo WU, Cheung YY, Lin CH, Sham PC, Cheng VC, Ng TK, Que TL, Chow KH. 2012. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying bla NDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerg Microbes Infect* 1:e39.
20. Sonnevend A, Al Baloushi A, Ghazawi A, Hashmey R, Girgis S, Hamadeh MB, Al Haj M, Pal T. 2013. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol* 62:1044-50.
21. Cerdeira LT, Cunha MPV, Francisco GR, Bueno MFC, Araujo BF, Ribas RM, Gontijo-Filho PP, Knobl T, de Oliveira Garcia D, Lincopan N. 2017. IncX3 plasmid harboring a non-Tn4401 genetic element (NTEKPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. *Diagn Microbiol Infect Dis* 89:164-167.
22. Shen P, Zhang Y, Li G, Jiang X. 2016. Characterization of the genetic environment of the blaKPC-2 gene among *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese Hospital. *Braz J Infect Dis* 20:384-8.
23. Ho PL, Cheung YY, Lo WU, Li Z, Chow KH, Lin CH, Chan JF, Cheng VC. 2013. Molecular Characterization of an Atypical IncX3 Plasmid pKPC-NY79 Carrying bla KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol* 67:493-8.
24. Kassis-Chikhani N, Frangeul L, Drieux L, Sengelin C, Jarlier V, Brisse S, Arlet G, Decre D. 2013. Complete nucleotide sequence of the first KPC-2- and SHV-12-encoding IncX plasmid, pKpS90, from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:618-20.
25. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2143-5.

26. Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2013. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 57:269-76.
27. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Perez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matte MH, Lira DP, Mamizuka EM, Lincopan N. 2016. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6415-7.
28. Sellera FP, Fernandes MR, Sartori L, Carvalho MP, Esposito F, Nascimento CL, Dutra GH, Mamizuka EM, Perez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Lincopan N. 2017. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and blaCTX-M genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Antimicrob Chemother* 72:1255-1256.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho, foi mostrado a identificação da enzima OXA-370 em isolados de *Enterobacteriaceae* no estado do Rio Grande do Sul. Apesar da frequência do gene *bla*_{OXA-370} ser baixa nas amostras da coleção estudada, a presença deste gene em amostras de diversas espécies de enterobactérias e em isolados detectados em cinco hospitais localizados no Rio Grande do Sul indicam seu potencial de disseminação. Adicionalmente, este estudo mostrou a presença deste gene em diferentes grupos clonais de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *E. coli*.

Um elevado nível de resistência a penicilinas associadas a inibidores de β -lactamase foi observado nos isolados produtores de OXA-370, porém, os níveis de resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem foram baixos, o que sugere que esta enzima não tenha atividade significativa para esta classe de β -lactâmicos.

Este trabalho mostrou pela primeira vez a sequência completa de nucleotídeos de plasmídeos que abrigam o gene *bla*_{OXA-370}. Todos os plasmídeos caracterizados pertencem ao grupo de incompatibilidade IncX, responsável pela disseminação de genes de resistência em diferentes países, e são semelhantes em tamanho, com média de 70 kb.

O estudo mostrou a presença de plasmídeos altamente similares em clones diferentes. Todos os plasmídeos sequenciados apresentam em sua estrutura um operon *virB*, que está associado a transferência de plasmídeos por meio da conjugação.

Os resultados de caracterização genética dos plasmídeos portadores de OXA-370 permitiram identificar uma estrutura comum aos seis plasmídeos sequenciados, designado Tn6435. Estes achados podem ser considerados inovadores, uma vez que o transpóson Tn6435 possui baixa similaridade com outras estruturas já caracterizadas e é comum aos plasmídeos portadores de *bla*_{OXA-370} descritos caracterizados neste trabalho. Parte da estrutura que compõe estrutura Tn6435 havia sido identificada na descrição original de OXA-370, em que o gene *bla*_{OXA-370} estava abrigado em um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncF. Os dados apresentados no presente estudo evidenciam a capacidade de transferência deste gene em plasmídeos pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade.

7. REFERÊNCIAS

- Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, Solter E, Benenson S, Masarwa S, Carmeli Y. Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother.* 2011
- Aires CA, Rocha-de-Souza CM, Timm LN, Pereira PS, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring bla(CTX-M-8) in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016
- Aires CA, Pereira PS, de Araujo CF, Chagas TP, Oliveira JC, Buonora SN, Albano RM, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017
- Aktas Z, Poirel L, Oncul O *et al.* Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* isolates harbouring OXA-48 carbapenemase, Turkey. In: Abstracts of the Twenty-second European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, UK, 2012. Abstract R2590. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
- Al Bayssari C, Olaitan AO, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015
- Alotaibi FE, Bukhari EE, Al-Mohizea MM, Hafiz T, Essa EB, AlTokhais YI. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from patients in a university hospital in Saudi Arabia. Epidemiology, clinical profiles and outcomes. *J Infect Public Health.* 2017
- Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980
- Antonelli A, D'Andrea MM, Vaggelli G, Docquier JD, Rossolini GM. OXA-372, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from a *Citrobacter freundii* isolated from a hospital wastewater plant. *J Antimicrob Chemother.* 2015

Antonelli A, Di Palo DM, Galano A, Becciani S, Montagnani C, Pecile P, Galli L, Rossolini GM. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015

Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of β -lactam resistance genes. *J Bacteriol*. 2006

Balm MN, La MV, Krishnan P, Jureen R, Lin RT, Teo JW. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clin Microbiol Infect*. 2013

Bogaerts P, Naas T, Saegeman V, Bonnin RA, Schuermans A, Evrard S, Bouchahrouf W, Jove T, Tande D, de Bolle X, Huang TD, Dortet L, Glupczynski Y. OXA-427, a new plasmid-borne carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2017

Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Jumas-Bilak E, Sirot J. Chromosome encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002

Bonnin RA, Nordmann P, Carattoli A, Poirel L. Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013

Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012

Borah VV, Saikia KK, Hazarika NK. First report on the detection of OXA-48 β -lactamase gene in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection isolated from a patient in a Tertiary Care Hospital in Assam. *Indian J Med Microbiol*. 2016

Both A, Huang J, Kaase M, Hezel J, Wertheimer D, Fenner I, Günther T, Grundhoff A, Büttner H, Aepfelbacher M, Rohde H, Hentschke M. First report of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and OXA-232. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016

Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2000

Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010

Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, Herndon DR, Kappmeyer LS, Daniels JB, Besser TE. blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010

Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco BM, Magagnin CM, Leiroz LK, de Oliveira TG, de Faria-Júnior C, Cerdeira LT, Barth AL, Sampaio SC, Zavascki AP, Poirel L, Sampaio JL. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012

Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009

Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One*. 2015

Carneiro M, Gonçalves RA, de Souza JG, Teixeira CB, Krummenauer EC, Machado JA, Waib LF, Pina Trench FJ. New carbapenases in Brazil. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014

Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, da Silva AC, Palermo RL, Romanin P, Venâncio E, Perugini MR, Pelisson M, Gales AC. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015

Carrër A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. Occurrence of a SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents*. 2008a.

Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008b

Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013

Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report

from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011

Cayô R, Leme RC, Streling AP, Matos AP, Nodari CS, Chaves JR, Brandão JL, de Almeida MF, Carrareto V, de Castro Pereira MA, de Almeida JP, Ferreira DC, Gales AC. *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017

Chen L, Al Laham N, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015

Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, Dortet L, Naas T. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* 2015

Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003

Da Silva GJ, Quinteira S, Bértolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J Antimicrob Chemother.* 2004

De Luca F, Benvenuti M, Carboni F, Pozzi C, Rossolini GM, Mangani S, Docquier JD. Evolution to carbapenem-hydrolyzing activity in noncarbapenemase class D β -lactamase OXA-10 by rational protein design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011

de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP. Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006

Docquier JD, Calderone V, De Luca F, Benvenuti M, Giuliani F, Bellucci L, Tafi A, Nordmann P, Botta M, Rossolini GM, Mangani S. Crystal structure of the OXA-48 β -lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. *Chem Biol*. 2009

Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill*. 2017

Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*. 2012

Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015

Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β -lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015

Duarte A, Boavida F, Grosso F, Correia M, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003

Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, Barrero Barreto ER, Marquez-Ortiz RA,

Moncada Guayazán MV, Vanegas Gómez N. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013

Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014

Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, Salimnia TT, Mitchell RA, Alangaden G, Salimnia H. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011

Fernández J, Montero I, Martínez Ó, Fleites A, Poirel L, Nordmann P, Rodicio MR. Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2015

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ*. 2001

Forsythe S, Abbott S, Pitout J. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Eleventh edition. ASM Press, Washington 2015; 714-37

Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, Alexandrova IA, Kurdyumova NV, Sazikina SY, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Dyatlov IA. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015

García Sanchez JE, Fresnadillo Martínez MJ, ArceArce JJ, García Sanchez E. Antibióticos β lactámicos. In: García Sanchez JE, López R, Prieto J, editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona. 1a ed. Prous Science; 1999

Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000

Giani T, Conte V, Di Pilato V, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, Rossolini GM. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012

Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2002

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010

Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, Verbruggen AM, Deplano A, Denis O, Bogaerts P. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012

Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettioli M, Veliz O, De Belder D, Rapoport M, Gatti B, Petroni A, Corso A. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2013

Goren MG, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. *J Antimicrob Chemother.* 2011

Göttig S, Hamprecht AG, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 2013

Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J. Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. *PLoS One.* 2016

Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004

Héritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008

Hojabri Z, Mirmohammadkhani M, Kamali F, Ghassemi K, Taghavipour S, Pajand O. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30/H30-Rx subclones recovered from extra-intestinal infections: first report of OXA-48 producing ST131 clone from Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017

Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y; multicentre study group. Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in *Enterobacteriaceae* isolates from 24 hospitals in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2013

Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med.* 2017

Jao YT, Wang WH, Wang A, Siu LK, Lu PL. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017

Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995

Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol.* 2005

Khajuria A, Prahara AK, Grover N, Kumar M. First report of an *Enterobacter ludwigii* isolate coharboring NDM-1 and OXA-48 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013

Kalpo JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J Med Microbiol.* 2011

Khajuria A, Prahara AK, Kumar M, Grover N. Emergence of *Escherichia coli*, Co-Producing NDM-1 and OXA-48 Carbapenemases, in Urinary Isolates, at a Tertiary Care Centre at Central India. *J Clin Diagn Res.* 2014

Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017

Kraiem AG, Zorgani A, Elahmer O, Hammami A, Chaaben BM, Ghenghesh KS. New Delhi metallo- β -lactamase and OXA-48 carbapenemases in gram -negative bacilli isolates in Libya. *Libyan J Med.* 2015

Lauret L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999

Liu X, Thungrat K, Boothe DM. Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and Other β Lactamase Genes in ESBL-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* from Dogs and Cats in the United States, 2009-2013. *Front Microbiol.* 2016

Livermore DM. β -Lactamases- the Threat Renews. *Curr Protein Pept Sci.* 2009

Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006

Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol.* 2002

Loucif L, Kassah-Laouar A, Saidi M, Messala A, Chelaghma W, Rolain JM. Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving a Sequence Type 101 Clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016

Lowe CF, Kus JV, Salt N, Callery S, Louie L, Khan MA, Vearncombe M, Simor AE. Nosocomial transmission of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013

Lowman W, Sriruttan C, Nana T, Bosman N, Duse A, Venturas J, Clay C, Coetzee J. NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. *S Afr Med J.* 2011

Lunha K, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, Chaimanee P, Angkititrakul S, Chetchotisakd P. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016

Lyman M, Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Limbago B, Kallen A. Notes from the Field: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Producing OXA-48-like Carbapenemases--United States, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015

Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017

Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014

Martinez T, Martinez I, Vazquez GJ, Aquino EE, Robledo IE. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J Med Microbiol*. 2016

Martins WM, Nicoletti AG, Santos SR, Sampaio JL, Gales AC. Frequency of BKC-1-Producing *Klebsiella* Species Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016

Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frère JM. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*. 1998

Matar GM, Dandache I, Carrër A, Khairallah MT, Nordmann P, Sabra A, Araj GF. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum β -lactamase. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010

Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, Sifri CD. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "menace" arrives in the new world. *J Clin Microbiol*. 2013

Mathlouthi N, Areig Z, Al Bayssari C, Bakour S, Ali El Salabi A, Ben Gwierif S, Zorgani AA, Ben Slama K, Chouchani C, Rolain JM. Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. *Microb Drug Resist*. 2015

Melo LC, Boisson MN, Saras E, Médaille C, Boulouis HJ, Madec JY, Haenni M. OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog. *J Antimicrob Chemother*. 2017

Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, Breurec S, Garin B. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2011

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010

Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets*. 2016

Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des*. 1999

Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*. 2005

Nakano R, Okamoto R, Nagano N, Inoue M. Resistance to gram-negative organisms due to high-level expression of plasmid-encoded ampC β -lactamase blaCMY-4 promoted by insertion sequence ISEcp1. *J Infect Chemother*. 2007

Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005

Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, Oliveira V, Gales AC. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015

Nodari CS, Siebert M, Matte UD, Barth AL. Draft genome sequence of a GES-5 producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2017

Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect*. 2014

Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993

Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol. 2011

O'Brien DJ, Wrenn C, Roche C, Rose L, Fenelon C, Flynn A, Murphy V, FitzGerald SF, Fenelon LE, Crowley B, Schaffer K. First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. Euro Surveill. 2011

Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J, Oteo J; Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Programme. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. J Antimicrob Chemother. 2016

Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Fernández-García MD, Delgado-Iribarren A, Sánchez-Romero I, García-Picazo L, Miguel MD, Solís S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. J Antimicrob Chemother. 2013

Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2015

Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in gram negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009

Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Front Microbiol. 2013

Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993

Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015

Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram - negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010

Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Holfelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012

Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2010

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009

Piedra-Carrasco N, Fàbrega A, Calero-Cáceres W, Cornejo-Sánchez T, Brown-Jaque M, Mir-Cros A, Muniesa M, González-López JJ. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS One*. 2017

Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014

Pirš M, Andlovic A, Cerar T, Žohar-Čretnik T, Kobola L, Kolman J, Frelj T, Prešern-Štrukelj M, Ružič-Sabljić E, Seme K. A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Euro Surveill*. 2011

Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011

Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008

Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother.* 2011a

Poirel L, Bernabeu S, Fortineau N, Podglajen I, Lawrence C, Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011c

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012b

Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011b

Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003

Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D β -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004a

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004b

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007

Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012a

Poirel L, Ros A, Carrer A, Fortineau N, Carricajo A, Berthelot P, Nordmann P. Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J Antimicrob Chemother*. 2011d

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001

Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. 2011b

Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011c

Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013b

Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P. Occurrence of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene blaOXA-48 in the environment in Morocco. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011a

Potron A, Poirel L, Nordmann P. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011d

Potron A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. Characterisation of OXA-244, a chromosomally-encoded OXA-48-like β -lactamase from *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016

Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013c

Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, Nordmann P. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 2013a

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007

Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006

Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000

Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, Barth AL, Zavascki AP. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014

Ribeiro VB, Zavascki AP, Rozales FP, Pagano M, Magagnin CM, Nodari CS, da Silva RC, Dalarosa MG, Falci DR, Barth AL. Detection of bla(GES-5) in carbapenem-resistant

Kluyvera intermedia isolates recovered from the hospital environment. Antimicrob Agents Chemother. 2014

Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC, Sampaio JL, Barth AL. Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant Kluyvera georgiana. J Antimicrob Chemother. 2012

Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado A, Barth AL, Zavascki AP. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. Int J Infect Dis. 2014

Rozales FP, Lovison OA, Magagnin CM, Martins AS, Crispim MN, Zavascki AP, Barth AL. Characteristics of Enterobacteriaceae Isolates Coharboring Distinct Carbapenemase Genes. Infect Control Hosp Epidemiol. 2017

Saïdani M, Hammami S, Kammoun A, Slim A, Boutiba-Ben Boubaker I. Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Tunisia. J Med Microbiol. 2012

Skalova A, Chudejova K, Rotova V, Medvecký M, Studentova V, Chudackova E, Lavicka P, Bergerova T, Jakubu V, Zemlickova H, Papagiannitsis CC, Hrabak J. Molecular Characterization of OXA-48-Like-Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic and Evidence for Horizontal Transfer of pOXA-48-Like Plasmids. Antimicrob Agents Chemother. 2017

Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. Braz J Microbiol. 2016

Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochévis LC, Barth AL, Zavascki AP. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in Enterobacter hormaechei from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2014

Suárez C, Gudiol F. [β -lactam antibiotics]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009

Tacão M, Araújo S, Vendas M, Alves A, Henriques I. *Shewanella* species as the origin of bla(OXA-48) genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017

Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, Ohmagari N, Kirikae T. Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2017

Thomas CP, Moore LS, Elamin N, Doumith M, Zhang J, Maharjan S, Warner M, Perry C, Turton JF, Johnstone C, Jepson A, Duncan ND, Holmes AH, Livermore DM, Woodford N. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents*. 2013

Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2011

Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2005

Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother*. 2013

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010

Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006

Williamson DA, Heffernan H, Sidjabat H, Roberts SA, Paterson DL, Smith M, Freeman JT. Intercontinental transfer of OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* into New Zealand. *J Antimicrob Chemother.* 2011

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram -negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009

Zong Z. Discovery of bla(OXA-199), a chromosome-based bla(OXA-48)-like variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PLoS One.* 2012

Zou D, Huang Y, Zhao X, Liu W, Dong D, Li H, Wang X, Huang S, Wei X, Yan X, Yang Z, Tong Y, Huang L, Yuan J. A novel New Delhi metallo- β -lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese Hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015

8. ANEXO

8.1 Trabalhos publicados em colaboração

Rozales FP, Lovison OA, Magagnin CM, Martins AS, Crispim MN, Zavascki AP, Barth AL. Characteristics of Enterobacteriaceae Isolates Coharboring Distinct Carbapenemase Genes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017

Nodari CS, Gales AC, Barth AL, Magagnin CM, Zavascki AP, Carvalhaes CG. Detection of OXA-370 directly from rectal swabs and blood culture vials using an immunochromatographic assay. J Microbiol Methods. 2017

Rozales FP, Magagnin CM, Campos JC, Pagano M, Nunes LS, Pancotto LR, Sampaio JLM, Zavascki AP, Barth AL. Characterization of Transformants Obtained From NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017

Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco BM, Magagnin CM, Leiroz LK, de Oliveira TG, de Faria-Júnior C, Cerdeira LT, Barth AL, Sampaio SC, Zavascki AP, Poirel L, Sampaio JL. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015

Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado A, Barth AL, Zavascki AP. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2014

Zavascki AP, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Ribeiro VB, Rozales FP, Luz I, Magagnin CM, Vieira FJ, Sampaio JM, Barth AL. Heteroresistance to carbapenems in New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing isolates: a challenge for detection? Infect Control Hosp Epidemiol. 2014

Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochévis LC, Barth AL, Zavascki AP. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014

Ribeiro VB, Zavascki AP, Rozales FP, Pagano M, Magagnin CM, Nodari CS, da Silva RC, Dalarosa MG, Falci DR, Barth AL. Detection of bla(GES-5) in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014

