

FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA FREITAS

**Epidemiologia de β -Lactamases Adquiridas do tipo AmpC em Isolados
Clínicos Humanos de *Enterobacteriaceae***



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO

2011

FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA FREITAS

**Epidemiologia de β -Lactamases Adquiridas do tipo AmpC em Isolados
Clínicos Humanos de *Enterobacteriaceae***



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO

2011

FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA FREITAS

**Epidemiologia de β -Lactamases Adquiridas do tipo AmpC em Isolados
Clínicos Humanos de *Enterobacteriaceae***

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação da Professora Doutora Elisabete Maria Pereira Machado da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e da Professora Doutora Luísa Maria Vieira Peixe da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE (Laboratório Associado) / Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Financiamento:

REQUIMTE – Financiamento Plurianual

SUMÁRIO

Os β -lactâmicos constituem antibióticos de primeira linha no tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae*, mas a resistência a estes compostos tem aumentado progressivamente, sendo uma das principais causas a produção de β -lactamases. Nestas incluem-se as AmpC adquiridas (qAmpC), cujos genes codificantes coexistem habitualmente com genes de resistência a outros antibióticos na mesma plataforma genética, limitando as opções terapêuticas. O objectivo global do presente trabalho consistiu em analisar a contribuição da expansão clonal e da transferência horizontal de genes na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC (sem AmpC indutível).

Foram analisados 675 isolados clínicos provenientes de 5 instituições de saúde Portuguesas (Norte e Centro). A identificação bacteriana e a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos foram realizadas por métodos universalmente aceites. A caracterização das qAmpC incluiu a realização do teste do ácido borónico, o teste do duplo sinergismo entre cefoxitina e a ceftazidima ou a cefotaxima, e a identificação de genes *bla*_{qAmpC} por PCR e sequenciação. Efectuou-se também a análise da estrutura populacional, da transferibilidade de *bla*_{qAmpC}, e análise plasmídica. O ambiente genético em torno dos genes *bla*_{qAmpC} foi também pesquisado (PCR, sequenciação).

A expressão de AmpC foi observada em 59% (59/100) dos isolados identificados como presumíveis produtores de qAmpC, detectando-se apenas entre os isolados resistentes à cefoxitina (66%, 59/89). Em 50% (50/100) dos isolados detectaram-se dois tipos distintos de genes *bla*_{qAmpC}, identificados como *bla*_{DHA-1} (94%, n=47/50) e *bla*_{CMY-2} (6%, n=3/50).

A co-produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), predominantemente do tipo SHV, é comum entre os isolados produtores de qAmpC. Reportam-se associações de genes *bla*_{qAmpC} e *bla*_{ESBL} nunca antes descritas. Em todos os isolados produtores de qAmpC se observou fenótipo de multirresistência, verificando-se elevadas taxas de resistência à maioria dos antibióticos: canamicina (98%), tobramicina (96%), sulfonamidas (96%), ceftazidima (94%), cefotaxima (88%), aztreonamo (84%), ciprofloxacina (82%), trimetoprim (80%), cloranfenicol (78%) e tetraciclina (70%). Os antibióticos com menores taxas de resistência foram: o meropenemo (0%), o imipenemo (4%), a cefepima (8%), a tigeciclina (8%) e a ampicacina (26%).

Genes *bla*_{DHA-1} ocorreram em diferentes espécies, *K. pneumoniae* (n=41), *K. oxytoca* (n=4) e *E. coli* (n=2), durante todo o período de estudo e na maioria das instituições analisadas, verificando-se uma grande diversidade clonal (n=14). Entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de DHA-1 foram identificados os clones ST11 (n=14, 2 tipos de PFGE) e ST443 (n=1), nos quais se confirmou a presença de *bla*_{DHA-1} em plasmídeos não transferíveis pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncR (50kb e 180 kb, respectivamente). Em *K. oxytoca* e *E. coli* *bla*_{DHA-1} detectou-se em plasmídeos não transferíveis pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncHI2 (300 e 350 kb, respectivamente) Estas associações nunca antes foram descritas.

Genes *bla*_{CMY-2} ocorreram apenas em *E. coli* (n=3), durante o período 2006-2007 e apenas em duas das instituições analisadas, verificando-se a presença de distintos clones (n=3) pertencentes ao grupo filogenético B1. Em dois clones, um dos quais da linhagem clonal ST101, *bla*_{CMY-2} foi encontrado em plasmídeos conjugativos de incompatibilidade IncK de 80 kb, enquanto no terceiro clone (B1-*fumC65*) *bla*_{CMY-2} se detectou em plasmídeos não transferíveis de incompatibilidade IncA/C₂ de 150 kb.

A epidemiologia de isolados produtores de qAmpCs em Portugal é complexa, parecendo envolver a disseminação de clones e/ou plasmídeos no caso de *bla*_{DHA-1}, e predominantemente plasmídeos, mas também sequências de inserção do tipo *ISEcp1* no caso de *bla*_{CMY-2}.

ABSTRACT

β -lactam antibiotics are first-line treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae*, but resistance to these compounds is increasing, being β -lactamase production one of the key causes. These include the acquired AmpCs (qAmpCs), which encoding genes usually coexist with other antibiotic resistance genes in the same genetic platform, thus limiting therapeutic options. The main goal of this study was to assess the contribution of clonal expansion and horizontal gene transfer in the dissemination of qAmpC-producing *Enterobacteriaceae* lacking inducible AmpC.

We analyzed 675 clinical isolates from five Portuguese health institutions (North and Centre) during a seven year period (2002-2008). The identification and antimicrobial susceptibility tests were performed using standard procedures. qAmpC characterization included the boronic acid test, the double disk synergy test between ceftazidime and ceftazidime or cefotaxime, and identification of *bla*_{qAmpC} genes by PCR and sequencing. Population structure analysis, *bla*_{qAmpC} transfer capability and plasmid characterization was also done. The genetic environment surrounding *bla*_{qAmpC} genes was also investigated (PCR, sequencing).

qAmpC expression was observed in 59% (59/100) of the presumptive qAmpC producers, being detected only among ceftazidime resistant isolates (66%, 59/89). *bla*_{qAmpC} genes were detected in 50% (50/100) of the selected isolates, of which 94% (n=47/50) were identified as *bla*_{DHA-1} and 6% (n=3/50) as *bla*_{CMY-2}.

ESBL co-production was frequently detected among qAmpC-producers, predominantly of the SHV-type. Here we report several new *bla*_{qAmpC} and *bla*_{ESBL} associations. All qAmpC producers had a multidrug resistance phenotype, and high resistance rates to most antibiotics: kanamycin (98%), tobramycin (96%), sulfonamides (96%), ceftazidime (94%), cefotaxime (88%), aztreonam (84%), ciprofloxacin (82%), trimethoprim (80%), chloramphenicol (78%) and tetracycline (70%). The lower resistance rates were observed for: meropenem (0%) to imipenem (4%), cefepime (8%), tigecycline (8%) and amikacin (26%).

*bla*_{DHA-1} genes occurred in different species, *K. pneumoniae* (n = 41), *K. oxytoca* (n = 4) and *E. coli* (n = 2) and in a multiclonal scenario (n=14), throughout all the study period and in most of the analyzed institutions. Among DHA-1-producing *K. pneumoniae* the ST11 (n=14) and ST443 (n=1) clones were identified, in which

*bla*_{DHA-1} was carried within IncR non-transferable plasmids belonging to incompatibility group IncR (of 50 and 180 kb, respectively). In *K. oxytoca* and *E. coli* *bla*_{DHA-1} was carried within non-transferable plasmids belonging to incompatibility group IncHI2 (of 300 and 350 kb, respectively). These associations are described here for the first time.

*bla*_{CMY-2} genes occurred only in *E. coli* (n=3) from three distinct clones belonging to phylogenetic group B1, during the 2006-2007 period, and only in two of the analyzed institutions. In two clones, one of the ST101 clone, *bla*_{CMY-2} was carried within IncK conjugative plasmids of 80 kb, while in the third clone (B1-*fumC65*) *bla*_{CMY-2} was carried within IncA/C₂ non-transferable plasmid of 150 kb.

In Portugal the epidemiology qAmpC producers is quite complex, and seems to involve clonal and / or plasmid dissemination in the case of *bla*_{DHA-1}, and predominantly plasmids, but also insertion sequences like *ISEcp1* in the case *bla*_{CMY-2}.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é dedicada à minha mulher Mónica, por me ter apoiado na decisão de candidatura a este mestrado, pelo carinho e amor que me deu quando mais precisava, e pelo tempo que não lhe pude dedicar, por vezes quando era necessário. Peço-lhe desculpa pelas intermináveis horas que passei ao computador. Ao meu filho João Carlos pelos dias que passou na minha ausência e pelas brincadeiras que não tivemos.

Aos meus pais, Fernando e Isilda que sempre me apoiaram e que muito contribuíram para a minha formação.

À Professora Doutora Elisabete Machado, orientadora desta tese, por me ter atribuído este projecto e acreditar que eu era capaz de o realizar, mesmo estando na situação de trabalhador-estudante. Por me ter transmitido bastante do que sabe, e apoiado quando da realização de algumas tarefas mais complexas e demoradas desta investigação. Dedico-lhe especial agradecimento, porque mesmo antes e após o nascimento do seu filho Daniel, sempre respondeu às minhas solicitações.

À Professora Doutora Luísa Peixe, por ser co-orientadora desta tese, e pelo apoio que me concedeu.

Ao Dr. Ricardo Silva, técnico analista clínico, responsável pela boa organização do Laboratório de Microbiologia do CEBIMED, sem o qual não teria os materiais e as condições indispensáveis à realização da investigação.

Às Professoras Doutoradas Patrícia Antunes e Ângela Novais, pela disponibilidade em me cederem materiais e local de trabalho nas minhas idas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, onde se realizaram algumas tarefas.

Aos amigos Joaquim, Sílvia e Joana por me acolherem em suas casas nas minhas deslocações ao Porto para trabalhar na investigação, e pelo companheirismo que me concederam.

Aos meus amigos Moisés, Maria José, Zé Alberto e Lurdes.

À Liliana Grenho, Ricardo Escada, Ana Paula, Nair e Professora Doutora Amélia Assunção, colegas de mestrado e de trabalho diário, pela boa companhia que constituíram, e que bem é precisa quando se está a trabalhar longe de casa.

Aos Professores Doutores João Carlos Sousa, Carla Novais e Fátima Cerqueira, por terem aceiteado a minha candidatura a este mestrado, e responderem prontamente às minhas solicitações.

Aos Srs. contínuos da Faculdade de Saúde da Universidade Fernando Pessoa, pela simpatia e disponibilidade que sempre tiveram para comigo, quando eu necessitava de começar a trabalhar mais cedo ou sair mais tarde.

Ao Hospital São Teotónio e ao seu Serviço de Patologia Clínica, por me concederem o estatuto de trabalhador-estudante, e também pelo envio de estirpes bacterianas para este estudo.

Às minhas colegas do Serviço de Patologia Clínica do Hospital São Teotónio, Helena Lírio e Luísa Frias pela amizade e disponibilidade em efectuar alterações pontuais de horários para que eu me deslocasse ao Porto para trabalhar.

Um trabalho de investigação não se faz sozinho, sendo sempre a soma de muitas contribuições sem as quais seria impossível de realizar, guiadas pela força de vontade e determinação do indivíduo, indispensáveis à conclusão do projecto.

A todos o meu muito obrigado!

ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
NOMENCLATURA.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Antibióticos β -lactâmicos	2
2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> ..3	
2.1. Diminuição da permeabilidade.....	4
2.2. Bombas de efluxo	4
2.3. Inativação enzimática.....	5
3. Resistência aos antibióticos β -lactâmicos por produção de β -lactamases	5
3.1. Classificação das β -lactamases	5
3.1.1. β -Lactamases de espectro alargado (ESBLs)	6
3.1.2. Carbapenemases	6
3.2. β -Lactamases do tipo AmpC	7
3.2.1. β -Lactamases AmpC de localização cromossômica	8
3.2.2. β -Lactamases AmpC adquiridas ou transferíveis (<i>qAmpC</i>)	10
3.2.2.1. Propriedades enzimáticas gerais e específicas.....	11
3.2.2.2. Epidemiologia, evolução e ambiente genético	15
3.2.2.2.1. <i>qAmpC</i> do tipo CMY-1, MOX e FOX.....	15
3.2.2.2.2. <i>qAmpC</i> do tipo CMY-2, LAT e CFE.....	16
3.2.2.2.3. <i>qAmpC</i> do tipo ACT e MIR	18
3.2.2.2.4. <i>qAmpC</i> do tipo DHA	19
3.2.2.2.5. <i>qAmpC</i> do tipo ACC.....	20
3.2.2.2.6. Distribuição global das <i>qAmpC</i>	22
3.2.2.3. Relevância clínica	22
3.2.2.4. Detecção e caracterização de β -lactamases <i>qAmpC</i>	25
3.2.2.4.1. Métodos fenotípicos	25
3.2.2.4.2. Métodos genotípicos	28
3.2.2.5. Associação de <i>bla_{qAmpC}</i> a outros genes de resistência a antibióticos	29
3.2.2.6. Reservatórios de genes <i>bla_{qAmpC}</i>	31

II. OBJECTIVOS	33
III. MATERIAL E MÉTODOS	34
1. Isolados bacterianos	34
2. Caracterização fenotípica	34
2.1. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos	34
2.2. Detecção da expressão de AmpCs	35
3. Detecção e caracterização molecular de genes <i>bla</i> _{qAmpC} e respectivo ambiente genético	36
3.1. Extracção de DNA	36
3.2. Amplificação de genes <i>bla</i> _{qAmpC} por PCR	36
3.3. Estudo do ambiente genético de <i>bla</i> _{qAmpC} por PCR	39
3.4. Electroforese	39
3.5. Purificação dos produtos de PCR	41
3.6. Sequenciação	41
4. Análise da estrutura populacional de <i>Klebsiella</i> spp. e <i>E. coli</i> produtores de qAmpC	42
4.1. Electroforese em campo pulsado (PFGE)	42
4.2. Multi-Locus Sequence Typing (MLST)	43
4.3. Determinação de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	44
5. Análise da transferibilidade de <i>bla</i> _{qAmpC}	44
6. Análise dos plasmídeos	45
6.1. Determinação do número e tamanho	45
6.2. Identificação do grupo de incompatibilidade	45
6.3. Identificação e caracterização de plasmídeos contendo <i>bla</i> _{qAmpC}	46
6.3.1. Southern Blot	46
6.3.2. Marcação das sondas e hibridação	47
IV. RESULTADOS	48
1. Detecção da expressão de AmpC	48
2. Ocorrência e diversidade de genes <i>bla</i> _{qAmpC}	48
3. Avaliação do teste PBA na detecção de qAmpC	50
4. Co-produção de ESBLs em isolados contendo <i>bla</i> _{qAmpC}	50
5. Resistência a antibióticos entre os isolados contendo <i>bla</i> _{qAmpC}	50

6. Análise da estrutura populacional de <i>Klebsiella</i> spp. e <i>E. coli</i> produtores de qAmpC	52
7. Análise da transferibilidade de <i>bla</i> _{qAmpC}	54
8. Análise plasmídica	54
9. Caracterização do ambiente genético de <i>bla</i> _{qAmpC}	56
9.1. Ambiente genético de <i>bla</i> _{DHA-1}	56
9.2. Ambiente genético de <i>bla</i> _{CMY-2}	57
V. DISCUSSÃO	61
1. Ocorrência e diversidade de genes <i>bla</i> _{qAmpC}	61
2. Detecção da expressão de qAmpC	64
3. Resistência a antibióticos e co-produção de ESBLs em isolados produtores de qAmpC	66
4. Contribuição de clones e de elementos genéticos transferíveis na dispersão de <i>bla</i> _{qAmpC}	72
4.1. <i>bla</i> _{DHA-1}	72
4.2. <i>bla</i> _{CMY-2}	77
VI. CONCLUSÕES	80
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
VIII. ANEXOS	111
ANEXO I. Comunicações apresentadas em congressos internacionais	111

ÍNDICE DE TABELAS

1. Classificação das β -lactamases bacterianas (adaptado de Bush e Jacoby, 2010).....	7
2. Origem e diversidade de diferentes tipos de qAmpC (adaptado de Jacoby, 2009)	11
3. CMIs de diversos β -lactâmicos nas estirpes clínicas e nos transconjugantes e/ou transformantes contendo <i>bla</i> _{DHA-1, -2, -3} (adaptado de Fortineau <i>et al.</i> , 2001; Gaillot <i>et al.</i> , 1997; Wu <i>et al.</i> , 2005)	14
4. <i>Primers</i> e condições de PCR usados para amplificação e sequenciação de genes <i>bla</i> _{qAmpC} e genes descritos no seu ambiente genético.....	37
5. <i>Primers</i> usados para PCR <i>mapping</i>	40
6. Ocorrência e diversidade de genes <i>bla</i> _{qAmpC}	49
7. Avaliação do teste PBA na detecção de qAmpC em comparação com os testes genotípicos	50
8. Características epidemiológicas dos isolados de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i> produtores de DHA-1 obtidos de instituições clínicas Portuguesas (2002-2008).....	58
9. Características epidemiológicas dos isolados de <i>E. coli</i> produtores de CMY-2 obtidos de hospitais Portugueses (2002-2008).....	59
10. Comparação entre as taxas de resistência a alguns antibióticos encontradas neste estudo e as descritas em outros trabalhos semelhantes.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estrutura química dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos.....	3
2. Mecanismo de indução de <i>bla</i> _{AmpC} de localização cromossômica.....	9
3. Relação filogenética entre as diversas qAmpC estabelecida através da homologia da sequência de aminoácidos	12
4. Distribuição global das qAmpC	23
5. Teste AmpC em disco (adaptado de Thomson, 2010).....	27
6. <i>K. pneumoniae</i> apresentando um resultado positivo no teste do ácido borônico	27
7. Detecção de enzimas qAmpC do tipo ACC pelo teste do duplo sinergismo (adaptado de Ruppé <i>et al.</i> , 2006)	28
8. Plasmídeo pNDM-HK contendo genes que codificam para as β -lactamases NDM-1, DHA-1 e TEM-1, assim como para mecanismos de resistência a outros antibióticos.....	30
9. Amplificação de genes <i>bla</i> _{qAmpC} por PCR	49
10. Resistência aos antibióticos entre os isolados produtores de qAmpC	51
11. Padrões de restrição gerados por PFGE após digestão do DNA genômico com <i>Xba</i> I.....	53
12. Representação esquemática dos elementos genéticos no ambiente de genes <i>bla</i> _{qAmpC}	60

NOMENCLATURA

ACC	AmpC adquirida do tipo ACC (<i>Ambler Class C</i>)
ACT	AmpC adquirida do tipo ACT (<i>AmpC type</i>)
AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AmpC	β -Lactamase AmpC
ATM	Aztreonamo
<i>bla</i>	Gene codificante de β -lactamases
<i>bla</i> _{qAmpC}	Gene codificante de β -lactamase adquirida do tipo AmpC
CAN	Canamicina
CAZ	Ceftazidima
CFE	AmpC adquirida do tipo CFE (<i>origem em <u>Citrobacter freundii</u></i>)
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMY	AmpC adquirida do tipo CMY (<i>cephamycins, activa sobre cefamicinas</i>)
CPD	Cefpodoxima
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase
DHA	AmpC adquirida do tipo DHA (<i>descoberta em <u>Dharan</u>, Arábia Saudita</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DDST	Teste do duplo sinergismo (<i>Double Disk Sinergy Test</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESAC	β -Lactamases AmpC de Espectro Alargado (<i>Extended-Spectrum AmpC</i>)
ESBL	β -Lactamase de Espectro Alargado (<i>Extended-Spectrum β-Lactamase</i>)
ETP	Ertapenemo
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
FOX	AmpC adquirida do tipo FOX (<i>active sobre cefoxitina</i>)

GEN	Gentamicina
GES	<i>Guyana ESBL</i>
IMP	Imipinemase
IMP	Imipenemo
IS	Sequência de Inserção
ISCR	<i>Insertion Sequence Common Region</i>
LAT	AmpC adquirida do tipo LAT (<i>active sobre latamoxef</i>)
MER	Meropenemo
MIR	AmpC adquirida do tipo MIR (<i>decoberta no Miriam Hospital, EUA</i>)
MLST	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
MOX	AmpC adquirida do tipo MOX (<i>active sobre moxalactamo</i>)
NAL	Ácido nalidixico
NDM-1	<i>New-Dehli Metallo-β-Lactamase</i>
NET	Netilmicina
Omp	Porina (<i>Outer Membrane Protein</i>)
OXA	Oxacilinase
PBA	Ácido fenilborónico (<i>Phenylboronic acid</i>)
PBPs	<i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforese em Campo Pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
qAmpC	β -Lactamase adquirida do tipo AmpC
SCCmec	<i>Staphylococcal Chromosomal Cassette mec</i>
SHV	<i>Sulphydryl reagent variable</i>
SPM	<i>São Paulo Metallo-β-Lactamase</i>
STM	Estreptomicina
SUL	Sulfonamidas
TEM	β -Lactamase do tipo TEM (<i>Temoniera</i> , nome do paciente)
TET	Tetraciclina
TGC	Tigeciclina
TMP	Trimetoprim
TOB	Tobramicina
VIM	<i>Verona Integron-Encoded Metallo-β-Lactamase</i>

I. INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos constitui actualmente um dos maiores problemas de Saúde Pública à escala global. O consumo exagerado e inapropriado de antibióticos tanto na medicina humana como animal tem sido reconhecido como uma das origens do problema, constituindo um importante factor de pressão selectiva conducente à emergência e disseminação de bactérias resistentes e/ou genes de resistência aos antibióticos (Goossens *et al.*, 2005). Contudo, outros factores também são importantes, como a grande capacidade de disseminação de alguns plasmídeos e clones bacterianos resistentes possuindo características adaptativas particulares (ex: *Escherichia coli* ST131), associados a verdadeiras epidemias internacionais (Cantón *et al.*, 2008; Woodford *et al.*, 2011), assim como a capacidade de diferentes unidades ou sistemas de captura genética (plasmídeos, transposões e integrões) adquirirem e expressarem novos genes de resistência (Cantón *et al.*, 2003).

A disseminação horizontal de genes de resistência é frequentemente veiculada por plasmídeos conjugativos, plasmídeos mobilizáveis e elementos integrativos conjugativos (ICEs), os quais podem ser transferidos entre microrganismos de espécies diferentes (Davies e Davies, 2010, Smillie *et al.*, 2010). Acredita-se que muitos destes determinantes de resistência são originários do cromossoma de certas espécies bacterianas, nomeadamente daquelas cujo reservatório é o ambiente, e que têm sido eficientemente transmitidos para a comunidade microbiana que afecta os humanos, especialmente para as *Enterobacteriaceae* (Cantón, 2009; Livermore, 2003).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bacilos de Gram negativo anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose, capazes de reduzir os nitratos a nitritos, e apresentando reacção de oxidase negativa e de catalase positiva (Farmer, 1999). Apesar da sua distribuição ubiqüitária, sendo maioritariamente comensais em mamíferos, as *Enterobacteriaceae* constituem uma importante causa de infecções, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, sendo os principais agentes de infecções urinárias e de bacteriémias, com particular destaque para as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Fluit *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2010).

Os β -lactâmicos constituem antibióticos de primeira linha no tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae*, mas a resistência a estes compostos tem aumentado progressivamente (ECDC, 2009). A produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) em *Enterobacteriaceae* é um dos mecanismos de resistência adquirido mais comum às diferentes classes de β -lactâmicos, incluindo os oximino- β -lactâmicos, tendo-se assistido mais recentemente à disseminação de um outro tipo de β -lactamases, as AmpC adquiridas (Jacoby, 2009).

1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os β -lactâmicos representam a maior classe de antibióticos, com mais de 50 moléculas disponíveis, as quais se encontram distribuídas por quatro grupos distintos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactamos e os carbapenemos (Poole, 2004). A base da sua estrutura molecular é o anel β -lactâmico central (Figura 1), que lhe confere capacidade de ligação aos PBPs bacterianos (*Penicillin-Binding Proteins*), o seu alvo de acção, e que são enzimas responsáveis pela síntese do peptidoglicano da parede celular (Therrien e Levesque, 2000). O complexo que se forma entre o anel β -lactâmico e os PBPs é muito estável, dada a elevada afinidade dos PBPs para o antibiótico β -lactâmico em detrimento do seu alvo natural (resíduo D-alanil-D-alanina). Desta forma, a síntese da parede celular fica inibida, ao mesmo tempo que são activadas as autolisinas bacterianas, justificando assim o perfil bactericida e mesmo bacteriolítico dos antibióticos β -lactâmicos (Suárez e Gudíol, 2009).

Os diferentes grupos de β -lactâmicos têm diferentes espectros de actividade antibacteriana, designadamente em consequência da diferente distribuição de PBPs entre as espécies bacteriana (Sousa, 2006), embora outros factores como a sua permeabilidade através dos canais de porina e a expulsão por bombas de efluxo sejam também determinantes. Em *E. coli* foram já descritos pelo menos 12 PBPs, o que explica a actividade da grande maioria dos β -lactâmicos frente a esta espécie (Pfeifle *et al.*, 2000).

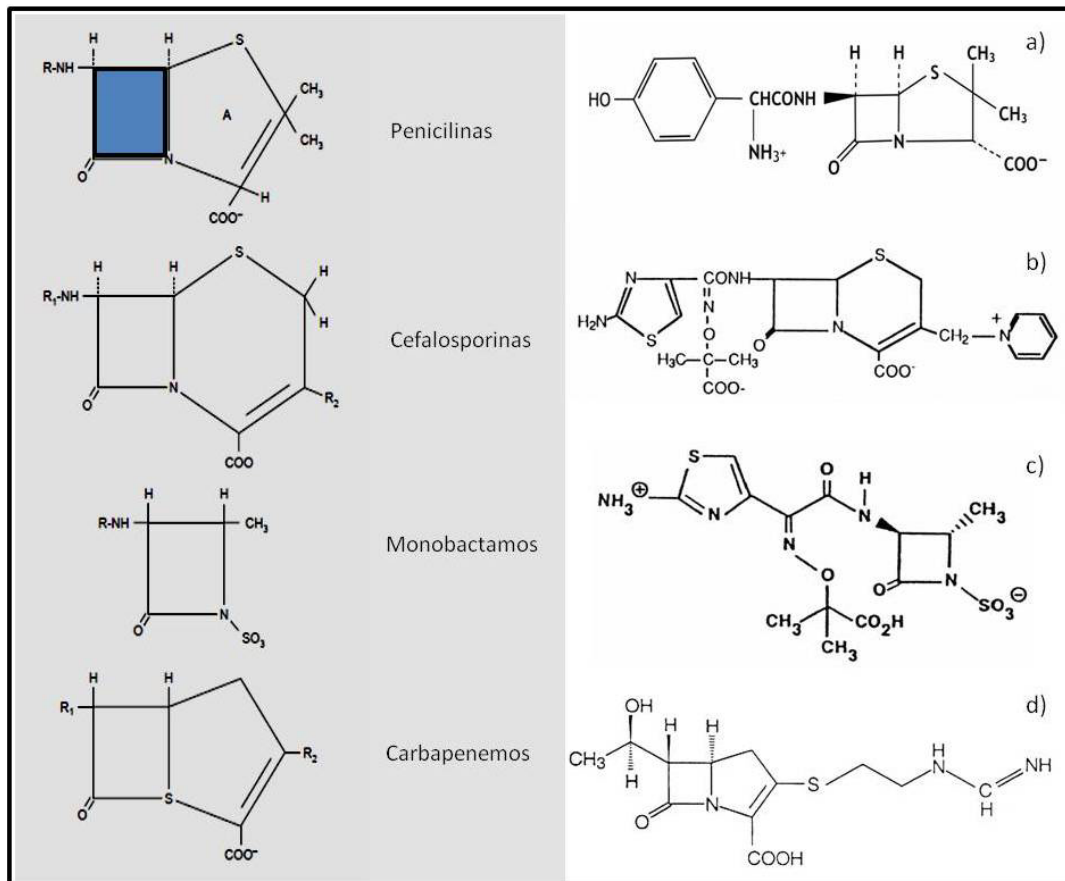


Figura 1. Estrutura química dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos. A azul representa-se o anel β -lactâmico central. Do lado esquerdo representa-se a estrutura base e do lado direito um elemento representativo de cada grupo: a) amoxicilina; b) cefotaxima, c) aztreonamo; d) imipenemo. (adaptado de Marín e Gudíol, 2003; Sousa, 2006).

2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS EM *ENTEROBACTERIACEAE*

Em *Enterobacteriaceae* a resistência adquirida aos β -lactâmicos ocorre principalmente por diminuição da permeabilidade da membrana externa, aumento da expressão de bombas de efluxo e produção de β -lactamases, cuja actuação pode ser independente ou simultânea, consoante o património genético adquirido pela célula bacteriana (Poole, 2004). A alteração ou aquisição de PBPs, é outro mecanismo que confere resistência aos β -lactâmicos, mas que assume pouca relevância em *Enterobacteriaceae*, ao contrário do que se verifica em bactérias de Gram positivo (Fuda *et al.*, 2004; Mendonça, 2009; Nichol *et al.*, 2002).

2.1. Diminuição da permeabilidade

Este mecanismo de resistência é mais importante em bactérias de Gram negativo, pois nestas a parede celular é mais complexa apresentando uma membrana externa seguida de uma camada de peptidoglicano (Silhavy, 2010), pelo que os antibióticos β -lactâmicos que são moléculas hidrofílicas, têm de penetrar a parede celular através de canais de porina para atingir o seu alvo (Sousa, 2006). Em *E. coli* e em *K. pneumoniae* mutações nas porinas OmpF/C e OmpK35/36, respectivamente, contribuem para a resistência ao ertapenemo, pois são os canais preferenciais para a sua entrada (Doménech-Sánchez *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010). O mesmo acontece com a perda da porina OprD em *Pseudomonas aeruginosa* e a consequente resistência aos carbapenemos (Nikaido, 2003). Por outro lado, Yigit *et al.* (2002) verificaram que a falta de expressão de análogos de porinas OmpC e OmpF em *Enterobacter aerogenes* resultava em resistência ao imipenemo e susceptibilidade diminuída ao meropenemo e cefepima. Estes dados realçam sobretudo a importância que este mecanismo de resistência assume na susceptibilidade aos carbapenemos, o grupo de β -lactâmicos com maior espectro de actividade (Sousa, 2006).

2.2. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras de metabolitos ou fármacos de dentro para o exterior da célula bacteriana (Poole, 2005). Usualmente são classificadas tendo em conta as suas características funcionais e relação filogenética (Saier, 2000). A maioria apresenta baixa especificidade de substrato, o que lhes permite transportar uma grande variedade de moléculas sendo usualmente codificadas no cromossoma bacteriano, enquanto as bombas de efluxo fármaco-específico são geralmente codificadas por plasmídeos (Poole, 2005). A hiperexpressão de bombas de efluxo do tipo MexAB-OprM tem sido associada a resistência aos carbapenemos em *P. aeruginosa* (Poole, 2005), enquanto em *E. coli* não produtoras de ESBLs a resistência à cefuroxima tem sido associada à hiperexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Källman *et al.*, 2009). Apesar da pouca importância habitualmente atribuída na resistência aos β -lactâmicos, Pages *et al.*, (2009), demonstrou recentemente em *K. pneumoniae* que o envolvimento das bombas de efluxo (no caso AcrAB-TolC) pode estar subestimado, desempenhando um papel fundamental na resistência a vários β -lactâmicos incluindo a cefoxitina.

2.3. Inativação enzimática

O mecanismo mais importante de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias de Gram negativo é a produção de enzimas denominadas β -lactamases. Estas enzimas hidrolizam o anel β -lactâmico impedindo o antibiótico de exercer a sua função, a acilação dos PBP's, dos quais são estruturalmente relacionados. (Poole, 2004). As β -lactamases são codificadas por genes *bla*, existindo actualmente próximo de 1000 sequências proteicas únicas descritas (<http://www.lahey.org/studies/>).

3. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS POR PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES

3.1. Classificação das β -lactamases

Dada a vasta diversidade de β -lactamases que foi sendo identificada, houve necessidade de desenvolver um esquema de classificação destas enzimas. Os mais consensuais são o esquema funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (1995) e o estrutural de Ambler (1980), ou a combinação de ambos (Bush e Jacoby, 2010; Tabela 1). O primeiro baseia-se na sua classificação tendo em conta o substrato preferencial e perfil de inibidores destas enzimas (Tabela 1), o segundo nas diferenças existentes no centro activo das enzimas e na sua sequência aminoacídica (Bush *et al.*, 1995). Assim a classe A de Ambler inclui as β -lactamases que possuem serina no centro activo, as quais apresentam habitualmente um peso molecular (P.M.) entre 28-30 kDa. A classe B engloba as metalo-enzimas dependentes de zinco, não inibidas pelo ácido clavulânico, e com P.M. entre 22-120 kDa. A classe C compreende as β -lactamases do tipo serina que hidrolizam preferencialmente as cefalosporinas, e na classe D incluem-se as β -lactamases do tipo serina que hidrolizam a oxacilina (Ambler, 1980).

Os esquemas de classificação das β -lactamases tornaram-se bastantes complexos, tornando-os menos acessíveis aos diferentes profissionais interessados, o que promoveu um debate sobre a utilidade dos esquemas de classificação tradicionais e a proposta de novo esquema (Livermore, 2008; Giske *et al.*, 2010). Neste documento será seguido o sistema “clássico” de Bush e Jacoby (2010) para a classificação e nomenclatura das β -lactamases.

De seguida serão abordadas as β -lactamases mais prevalentes em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, nomeadamente as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), as carbapenemases e as β -lactamases do tipo AmpC, sobre as quais se centra este trabalho, e que por isso terão uma análise mais aprofundada.

3.1.1. β -Lactamases de espectro alargado (ESBLs)

A produção de ESBLs é um dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos mais comuns em *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas apresentam serina no local activo e pertencem à classe A do esquema de classificação de Ambler e aos grupos 2be, 2ber e 2de da classificação funcional actualizada de Bush e Jacoby (2010). Têm como característica hidrolizarem as penicilinas, as cefalosporinas de estreito e largo espectro, com excepção das cefamicinas, os monobactamos, e os carbapenemos. São inibidas pelos inibidores de β -lactamases tazobactam e ácido clavulânico. (Livermore, 2008). Algumas β -lactamases de classe D (oxacillinases) podem também ser consideradas enzimas de “espectro alargado”. Existem várias famílias de ESBLs, algumas apresentando elevada prevalência mundial como por exemplo as do grupo TEM, SHV, CTX-M (Cantón *et al.*, 2008). A presença simultânea de mais do que um tipo de ESBL em isolados bacterianos de *Enterobacteriaceae* tem sido detectada cada vez mais frequentemente (Ryoo *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2008).

3.1.2. Carbapenemases

As carbapenemases, para além de actuarem sobre os carbapenemos, são um grupo de enzimas que apresentam como principal característica a capacidade de hidrolizar a grande maioria dos β -lactâmicos. Neste grupo podemos encontrar enzimas da classe A, B ou D de Ambler (Bush *et al.*, 1995). Das várias famílias existentes, têm assumido maior relevância as do tipo KPC, particularmente em *Enterobacteriaceae* (Nordmann e Poirel, 2002), as do tipo IMP e VIM, encontradas frequentemente em bacilos de Gram negativo não fermentadores (especialmente *P. aeruginosa*) e também em *Enterobacteriaceae* (Bush e Jacoby, 2010) e ainda as do tipo OXA que têm sido detectadas quase exclusivamente em *Acinetobacter* spp. (Peleg *et al.*, 2008).

Tabela 1. Classificação das β -lactamases bacterianas (adaptado de Bush e Jacoby, 2010).

Grupo de Bush-Jacoby	Classe Molecular de Ambler	Substrato(s) preferenciais	Inibida por		Enzima(s) Representativa (s)
			AC ou TZB ^a	EDTA ^b	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC de bactérias de Gram negativo, CMY-2, DHA-1
1e	C	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	+	-	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas de espectro alargado e monobactamos	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	-	-	SHV-10, TEM-30 (IRT-2)
2ber	A	Cefalosporinas de espectro alargado e monobactamos	-	-	TEM-50 (CMT-1)
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina e cefepima	+	-	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	±	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro alargado	±	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemos	±	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro alargado	+	-	CepA
2f	A	Carbapenemos	±	-	KPC-2, SME-1
3a	B (B1) B (B3)	Carbapenemos	-	+	IMP1-1, VIM-1 L1, CAU-1
3b	B (B2)	Carbapenemos	-	+	CphA, Sfh-1

^aAC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam; ^bÁcido etilenodiaminotetracético.

3.2. β -Lactamases do tipo AmpC

A primeira β -lactamase a ser descrita como causa de resistência à penicilina foi uma AmpC, detectada em *E. coli* no ano de 1940. No entanto, esse nome apenas lhe seria atribuído em 1973, através dos trabalhos desenvolvidos por Burman e colaboradores que verificaram a sua localização cromossômica. Estudos posteriores da sequência de aminoácidos (resíduo serina no local activo) e do perfil de substratos

(hidrolisam preferencialmente as cefalosporinas) e inibidores (não inibidas pelo ácido clavulânico) permitiram a sua inclusão na classe C de Ambler (1980) e no grupo 1 da classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (1995).

3.2.1. β -Lactamases AmpC de localização cromossômica

Diversos géneros bacterianos possuem β -lactamases do tipo AmpC codificada por genes localizados no cromossoma, sendo que o grupo mais numeroso se encontra na família *Enterobacteriaceae* (Jacoby, 2009). Na maioria das espécies desta família, a sua expressão basal é baixa, mas indutível na presença de β -lactâmicos, tais como as aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira geração e cefamicinas (cefotitina e cefotetan), os quais são rapidamente inactivados (Kaneko *et al.*, 2005). Os isolados produtores de β -lactamase AmpC indutível são por isso caracteristicamente resistentes à cefotitina (Mirelis *et al.*, 2006). O imipenemo é também um forte indutor, mas é estável à acção da β -lactamase AmpC (Goldstein, 2002).

Nas espécies com AmpC indutível (ex: *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter* spp.) o gene bla_{AmpC} tem a montante o seu regulador de transcrição, o gene *ampR*, cuja transcrição é efectuada de forma divergente (Naas *et al.*, 2002; Reisbig *et al.*, 2003).

O mecanismo de indução baseia-se no facto da paragem da síntese do peptidoglicano, causada por estes antibióticos β -lactâmicos, levar a uma acumulação excessiva no espaço periplasmático de 1,6-anidromuropéptidos (1,6-AMP) (Jacobs *et al.*, 1994). Estes são transportados para o citoplasma pela AmpG, uma permease transmembranar, onde em excesso se ligam a AmpR, um repressor que bloqueia a transcrição do gene bla_{AmpC} (Figura 2). O gene deixa assim de sofrer a influência do repressor e ocorre um aumento da sua transcrição (Petrosino *et al.*, 2002). Em condições normais, os 1,6-AMP que chegam ao citoplasma são convertidos a UDP-*N*-ácido-acetilmurâmico-pentapeptídeo (UDP-NacMur) pela acção de AmpD (amidase *N*-acetil-anidromuramil-L-alanina), e que além de necessários para a síntese da parede celular bloqueiam a transcrição de bla_{AmpC} através da ligação a AmpR (Kaneko *et al.*, 2005).

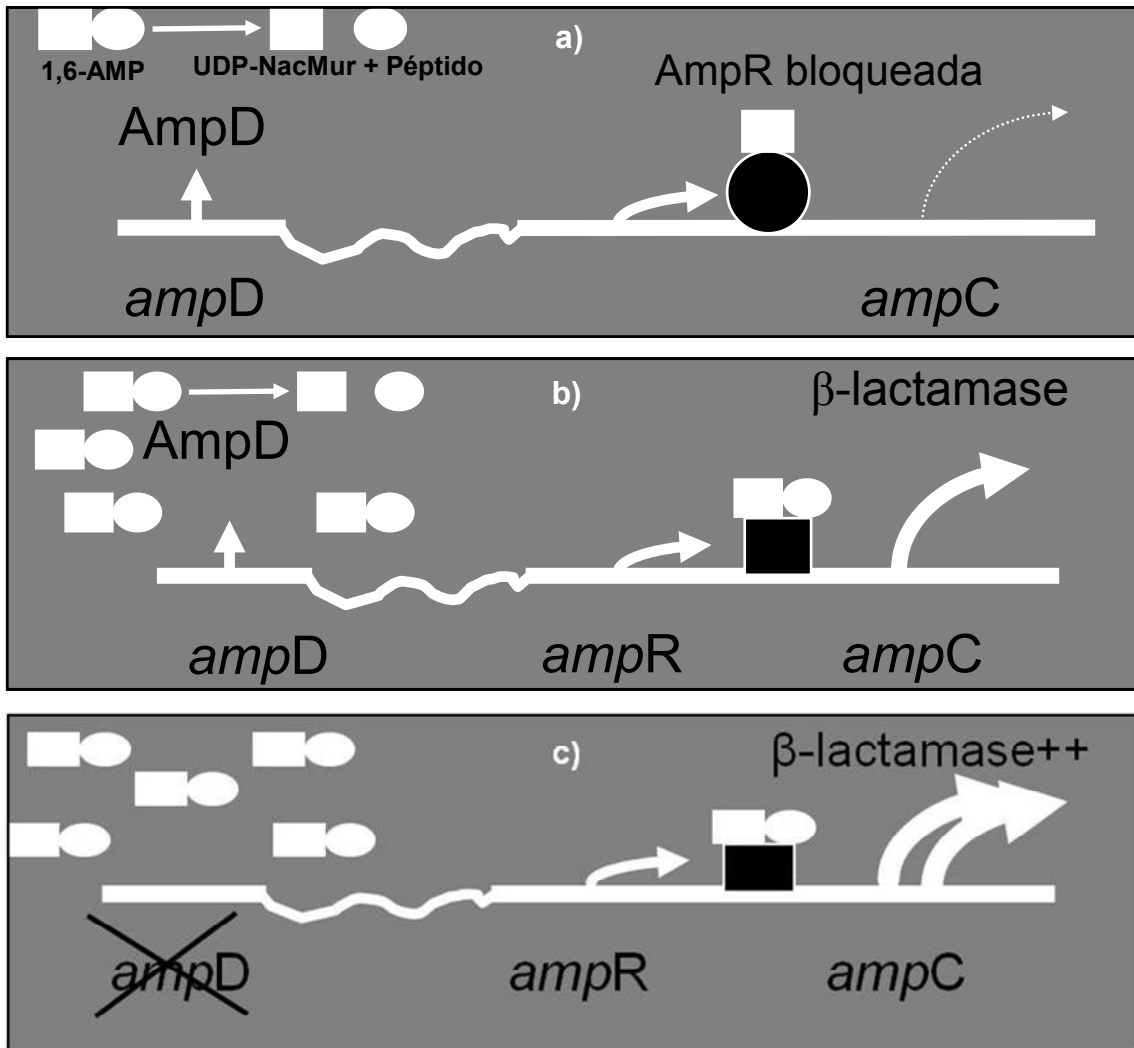


Figura 2. Mecanismo de indução de *bla*_{AmpC} de localização cromossômica. a) gene não induzido; b) gene induzido por β -lactâmico; c) gene desreprimido (adaptado de Livermore, 2003a).

Algumas estirpes chamadas desreprimidas, expressam constitutivamente altos níveis de β -lactamase AmpC. Isto deve-se principalmente a mutações no gene *ampD*, que originam uma proteína AmpD incapaz de realizar a sua função convenientemente, levando a acumulação excessiva de 1,6-AMP comparativamente a UDP-NacMur (Schmidtke e Hanson, 2006). Menos comuns são as mutações nos genes *ampR* e *ampG* (Jacoby, 2009).

Em *Escherichia coli* a expressão da β -lactamase AmpC cromossômica é muito baixa e não indutível, dado não possuir o gene *ampR*, sendo regulada por um fraco

promotor e por um forte atenuador da transcrição (Jaurin *et al.*, 1981). Contudo, pode ocorrer hiperexpressão devido a mutações nestas regiões (Haldorsen *et al.*, 2008). Adicionalmente, têm sido descritas mutações no local activo da enzima, nomeadamente em *E. coli*, originando estirpes com susceptibilidade reduzida a todas as cefalosporinas, incluindo cefepima e ceftiroma, que habitualmente não são afectadas por enzimas do tipo AmpC, as quais se denominaram de “*Extended-Spectrum AmpC β -lactamases*” (ESAC), dado o seu espectro catalítico mais alargado (Mammeri *et al.*, 2008). Recentemente as ESACs foram também descritas em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

Por outro lado, no cromossoma de *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis* *bla*_{AmpC} está naturalmente ausente (Jacoby, 2009). Contudo, nestas espécies, genes *bla*_{AmpC} têm sido frequentemente detectados em plasmídeos, assim como no cromossoma, designando-se por isso as enzimas expressas de AmpC adquiridas ou transferíveis (qAmpC).

3.2.2. β -Lactamases AmpC adquiridas ou transferíveis (qAmpC)

A primeira descrição de uma qAmpC deve-se a Bauernfeind e colaboradores (1989) num isolado de *K. pneumoniae* proveniente da Coreia do Sul. A enzima foi denominada CMY-1 dada a sua actividade sobre as cefamicinas, não sendo inibida pelo ácido clavulânico. No entanto, a nomenclatura das qAmpC foi evoluindo de forma um pouco caótica: algumas designações surgiram de acordo com a sua elevada actividade hidrolítica sobre a cefoxitina (tipo FOX), o moxalactamo (tipo MOX) ou o latamoxef (LAT-1); outras segundo o tipo de β -lactamase produzida, como o tipo AmpC (tipo ACT), ou classe C de Ambler (tipo ACC); pelo local da sua descoberta, como a MIR-1 (Miriam Hospital) ou DHA-1 (Dhahran Hospital); e finalmente pela bactéria na qual se identificou o gene codificante (CFE-1, de *Citrobacter freundii*) (Jacoby, 2006).

Actualmente estão descritas 119 variantes de β -lactamases do tipo AmpC (<http://www.lahey.org/studies/>), das quais aproximadamente 100 foram descritas em espécies que não o hospedeiro natural. Devido a esta elevada diversidade, as qAmpC são habitualmente classificadas em cinco grupos ou famílias, consoante a semelhança a

AmpCs cromossômicas de certas espécies de *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* spp. (Tabela 2) (Philippon *et al.*, 2002).

Tabela 2. Origem e diversidade de diferentes tipos de qAmpC (adaptado de Jacoby, 2009).

Origem	Tipo de qAmpC	Ano, País*	Enzimas		
<i>Aeromonas</i> spp.	CMY-1	1989, Coreia do Sul	CMY-1, -8, -9, -10, -11, -19		
	MOX	1993, Japão	MOX-1, -2, -8		
	FOX	1994, Argentina	FOX-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10		
<i>Citrobacter freundii</i>	CMY-2	1996, Grécia	CMY-2, -3, -4, -5, -6, -7, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -36, -38, -40, -43, -44, -45, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -64		
			LAT	1993, Grécia	LAT-1
			CFE	2004, Japão	CFE-1
<i>Enterobacter</i> spp.	ACT	1997, EUA	ACT-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9		
	MIR	1990, EUA	MIR-1, -4, -5		
<i>Morganella morganii</i>	DHA	1997, Arábia Saudita	DHA-1, -2, -3, 4, -5, -6, -7, -8		
<i>Hafnia alvei</i>	ACC	1999, Alemanha	ACC-1, -4		

*Ano e país da primeira descrição.

A relação evolucionária entre as diversas qAmpC pode ser visualizada através da análise da árvore filogenética representada na Figura 3, que contém algumas das enzimas representativas. As enzimas do tipo ACC (que derivam de *Hafnia alvei*) apresentam globalmente uma homologia da sequência de aminoácidos inferior a 40% relativamente às qAmpC derivadas de *Enterobacteriaceae* (35% entre ACC-3 e DHA-1), e pouco superior a 40% relativamente às qAmpC derivadas de *Aeromonas* spp., (FOX, MOX, CMY-1). Estas baixas similaridades verificam-se na maioria das relações, sugerindo que o género bacteriano do hospedeiro progenitor parece ser determinante. Por outro lado, dentro de cada grupo de qAmpC, a elevada homologia é a característica, por exemplo, 97% e 96% entre as do tipo CMY-1 e as do tipo CMY-2 respectivamente.

3.2.2.1. Propriedades enzimáticas gerais e específicas

Habitualmente as qAmpC têm um peso molecular entre 38-42 kDa e um ponto isoeléctrico (pI) muito próximo ou superior a 8.0, excepção feita às enzimas do tipo

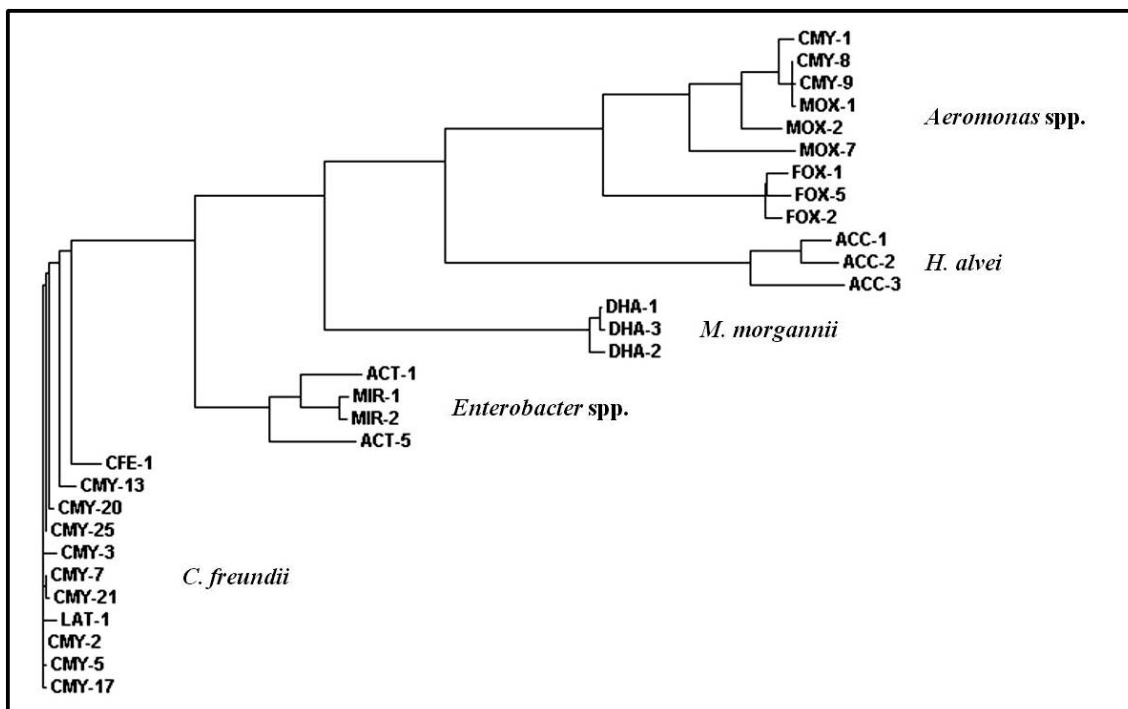


Figura 3. Relação filogenética entre as diversas qAmpC estabelecida através da homologia da sequência de aminoácidos (construída com recurso ao programa ClustalW2 acessível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

FOX que apresentam pI entre 6.4-7.2. Quanto ao número de aminoácidos presentes na enzima madura, este varia geralmente entre 377 (CMY-44) e 390 (ACC-2) (Philippon *et al.*, 2002).

As qAmpC conferem à bactéria um espectro de resistência aos antibióticos β -lactâmicos mais alargado que as ESBLs, hidrolisando penicilinas, oximinocefalosporinas e cefamicinas (cefoxitina, cefotetan), não sendo inativadas pelos inibidores de β -lactamases. A actividade sobre o aztreonamo é variável e as cefalosporinas de quarta geração retêm normalmente a sua actividade. Apenas os carbapenemos são estáveis às qAmpC (Jacoby, 2009). Contudo, existem excepções a este perfil, tendo-se verificado que CMY-2, ACT-1 e DHA-1 exibem eficiência catalítica frente a carbapenemos, podendo promover a emergência de resistência em isolados com perda de porinas (Mammeri *et al.*, 2010). Por outro lado as qAmpC do tipo ACC (que são relativamente raras) conferem à bactéria um fenótipo de resistência à ceftazidima, mas de susceptibilidade às cefamicinas (Bauernfeind *et al.*, 1999).

A expressão de qAmpC é maioritariamente constitutiva e de alto nível, quando comparada com a expressão de AmpC cromossômica indutível de algumas *Enterobacteriaceae* (Nakano *et al.*, 2007). Este facto deve-se a um conjunto de factores, nomeadamente a ausência de AmpR, AmpD ou o elevado número de cópias de *bla*_{qAmpC} por plasmídeo (Reisbig *et al.*, 2003). Contudo, CMY-13 e qAmpCs do tipo DHA e ACT são indutíveis, pois o gene *ampR* encontra-se adjacente a *bla*_{qAmpC} (Philippon *et al.*, 2002; Jacoby, 2009). *bla*_{CFE-1} tem também um gene *ampR* adjacente, mas a sua expressão é constitutiva, provavelmente devido a uma mutação em *ampR* (135 Asp → Ala) (Nakano *et al.*, 2004).

Como explicitado na Tabela 2, as enzimas do tipo CMY-1, MOX e FOX caracterizam-se pela elevada semelhança com a AmpC cromossômica de *Aeromonas* spp. (80%, 82% e 99%, respectivamente), a partir da qual terão evoluído, daí que o seu perfil hidrolítico seja também muito semelhante (Jacoby, 2009). Além de inactivarem as cefamicinas, conferem baixos níveis de resistência à ceftazidima e ao aztreonamo (Philippon *et al.*, 2002). CMY-19 tem ainda capacidade hidrolítica sobre a cefepima, não conduzindo contudo a fenótipos de resistência (Wachino *et al.*, 2006).

O perfil de resistência aos β -lactâmicos das qAmpC do tipo CMY-2, LAT e CFE é também muito similar. No entanto, enzimas do tipo CFE conduzem a concentrações mínimas inibitórias (CMI) mais elevadas frente à ceftazidima e à cefotaxima, enquanto enzimas do tipo CMY-2 são responsáveis por valores de CMI inferiores para a cefotaxima comparativamente com aquelas (Decré *et al.*, 2002; Philippon *et al.*, 2002; Literacka *et al.*, 2004). Outras qAmpC, como por exemplo CMY-33, e -44, têm a capacidade de hidrolizar a cefepima, conferindo um fenótipo de susceptibilidade reduzida (Doi *et al.*, 2009).

As enzimas do tipo ACT e MIR, cuja homologia é elevada com a AmpC cromossômica de *Enterobacter* spp. (Tabela 2), revelam diferenças significativas no perfil de hidrólise dos β -lactâmicos, dado que MIR-1 confere resistência à cefotaxima, ceftazidima e aztreonamo, ao contrário de ACT-1 que confere CMI baixas, no intervalo de susceptibilidade (Philippon *et al.*, 2002).

Entre as três variantes do tipo DHA (DHA-1, -2 e -3) cujos estudos de actividade são conhecidos, verifica-se que DHA-1 é a que conduz a níveis de resistência mais elevados aos antibióticos β -lactâmicos (Tabela 3), nomeadamente à piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e aztreonamo, enquanto os níveis mais baixos de resistência são associados à produção de DHA-2 (Fortineau *et al.*, 2001; Gaillot *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2005).

Como já foi referido anteriormente, bactérias produtoras de enzimas do tipo ACC apresentam um fenótipo de resistência à ceftazidima e susceptibilidade às cefamicinas. No entanto, quando comparados os valores de CMIs entre isolados produtores de diferentes variantes de enzimas ACC, verifica-se que ACC-4 conduz a CMIs mais elevadas à ceftazidima, cefotaxima, cefuroxima e aztreonamo comparativamente a ACC-1 (Papagiannitsis *et al.*, 2007). ACC-2, que apenas foi detectada no cromossoma de *H. alvei*, tem como particularidade conferir susceptibilidade reduzida a cefpiroma (Girlich *et al.*, 2000).

Tabela 3. CMIs de diversos β -lactâmicos nas estirpes clínicas e nos transconjugantes e/ou transformantes contendo *bla*_{DHA-1, -2, -3} (adaptado de Fortineau *et al.*, 2001; Gaillot *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2005).

Antibiótico	CMI (mg/L)					
	DHA-1		DHA-2		DHA-3	
	Ec ^a	Tc ^b	Ec	Ts ^c	Ec	Ts
Cefoxitina	256	128	128	16	256	32
Cefotaxima	256	64	32	4	64	16
Ceftazidima	512	64	256	8	128	32
Aztreonamo	128	16	32	2	---	---
Piperacilina	>512	128	>512	64	---	---
Amox-Clav ^d	>512	>512	>512	>512	---	---
Cefepima	0.25	0.125	0.12	0.03	0.5	0.12
Imipenemo	≤0.125	≤0.125	0.25	0.25	0.25	0.25

^a Estirpe clínica; ^b transconjugante; ^c transformante; ^d amoxicilina-ácido clavulânico.

3.2.2.2. *Epidemiologia, evolução e ambiente genético*

3.2.2.2.1. *qAmpC do tipo CMY-1, MOX e FOX*

Estas enzimas não são muito comuns, estando no entanto descritas pelo menos seis variantes entre as CMY-1, três do tipo MOX e dez do tipo FOX (<http://www.lahey.org/studies/>), cuja distribuição se apresenta restrita às *Enterobacteriaceae*, sendo que as CMY-1 têm sido descritas em grande parte no Sudeste Asiático, principalmente em *K. pneumoniae* (Pai *et al.*, 2004; Song, *et al.*, 2006). À excepção de MOX-2 descrita na Grécia, as do tipo MOX têm sido também detectadas no Sudeste Asiático e quase exclusivamente em *K. pneumoniae* (Horii *et al.*, 1994; Raskine *et al.*, 2002). As enzimas do tipo FOX aparecem descritas sobretudo na Europa e EUA, em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* (Alvarez *et al.*, 2004; Bou *et al.*, 2000; Marchese *et al.*, 1998). Em Portugal apenas recentemente se detectou a presença de genes bla_{FOX} num isolado clínico, não sendo no entanto indicada a variante e a espécie bacteriana (Manageiro *et al.*, 2010).

A disseminação clonal, assim como a transferência horizontal de plasmídeos contendo genes do tipo bla_{CMY-1} (bla_{CMY-10} e bla_{CMY-9} , respectivamente) já foram verificadas na Coreia do Sul e no Japão (Lee *et al.*, 2004; Wachino *et al.*, 2006). Nos EUA verificou-se a contribuição dos dois mecanismos na propagação de genes bla_{FOX-5} (Alvarez *et al.*, 2004). Relativamente às qAmpC do tipo MOX não existem dados que suportem o tipo de disseminação.

A evolução das enzimas do tipo CMY-1 e FOX resulta da acumulação de mutações pontuais, como verificado pelos achados de Lee *et al.* (2002) sobre o surgimento de bla_{CMY-11} a partir de bla_{CMY-1} via bla_{CMY-10} (homologia de 99% entre as 3 variantes), de Wachino *et al.* (2006) demonstrando a possível origem de bla_{CMY-19} a partir de bla_{CMY-9} (homologia de 99%), e de Bauernfeind *et al.* (1997) sobre a relação entre bla_{FOX-2} e bla_{FOX-1} . A análise da organização genética em torno de genes bla_{CMY-1} permitiu detectar a sua associação a sequências de inserção ISCRI (Insertion Sequence Common Region 1), envolvidas na mobilização de genes para integrões de classe 1, dos quais apenas bla_{CMY-9} foi investigado em detalhe (Toleman *et al.*, 2006). Por outro lado,

a região codificante de *bla*_{FOX-5} foi encontrada próxima de ISAS2, uma transposase de *Aeromonas salmonicida* (Queenan *et al.*, 2001).

Quanto às enzimas do tipo MOX, a literatura publicada é escassa. No entanto, a análise das sequências nucleotídicas depositadas no *GenBank* sugere a existência de dois *clusters*, um compreendendo MOX-1, -2, -3 e -4 (1149 nucleótidos), e outro incluindo MOX-5, -6, e -7 (1152 nucleótidos), verificando-se inserções, e deleções, além de mutações pontuais. Destas, apenas MOX-1, -2 e -8 (sequência ainda não depositada no *GenBank*) foram detectadas em espécies que não são consideradas hospedeiros naturais. O caso de MOX-1 é interessante pelo facto de apresentar maior homologia aminoacídica com as enzimas CMY-8 (99%) e CMY-9 (99%), do que com as outras do tipo MOX (79-93%) (Philippon *et al.*, 2002). Mesmo assim, MOX-1 é incluída no grupo das enzimas MOX dada a sua grande actividade sobre o moxalactamo (Philippon *et al.*, 2002). Os estudos de Horii *et al.* (1994) sugerem que a evolução de *bla*_{MOX-1} se deveu à integração do gene *bla*_{AmpC} cromossomal (que actualmente se supõe ser de *Aeromonas* spp.) num plasmídeo residente, seguido de conjugação. Na referida mobilização poderá ter estado envolvida ISCRI, a qual também já foi detectada no ambiente genético de *bla*_{MOX-1} (Toleman *et al.*, 2006).

3.2.2.2.2. qAmpC do tipo CMY-2, LAT e CFE

Estes três grupos de qAmpC caracterizam-se pela elevada similaridade com a AmpC cromossómica de *C. freundii*, sendo de 95%, 96% e 99% para as do tipo LAT-1, CMY-2 e CFE-1, respectivamente (Jacoby, 2009). O grupo do tipo CMY-2 é o que tem maior número de variantes descritas entre os grupos de qAmpC, existindo pelo menos quarenta e oito sequências destas enzimas disponíveis no *GenBank* e/ou em <http://www.lahey.org/studies/>.

A maioria destas enzimas foi descrita apenas uma vez em isolados específicos e num único país, como foram os casos de CMY-25, CMY-38, CMY-40, LAT-1 e CFE-1 (Empel *et al.*, 2008, Mata *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2004; Tzouveleki *et al.*, 1993). Contudo, CMY-2 é a que apresenta maior prevalência e distribuição mundial de entre todas as qAmpC descritas, mostrando uma maior associação a espécies como *E. coli* e *Salmonella* spp. (Deshpande *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Philippon *et al.*, 2002).

Recentemente, parece estar a ocorrer a emergência de CMY-4, sendo detectada principalmente na Europa, mas também no Norte de África e Sudeste Asiático, predominantemente em *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Salmonella* spp. (Batchelor *et al.*, 2005; Literacka *et al.*, 2004; Hammad *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2007).

Em Portugal, CMY-2 foi já detectada em isolados clínicos de *E. coli*, *C. freundii*, *P. mirabilis* e *Salmonella* Typhimurium (Antunes *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009; Manageiro *et al.*, 2010; Simões *et al.*, 2008). Uma nova qAmpC do tipo CMY-2 foi também recentemente descrita (Manageiro *et al.*, 2010), tendo-se denominado CMY-46 e diferindo de CMY-2 em nove mutações que conduziram a nove substituições de aminoácidos.

Não existe um mecanismo de disseminação do gene *bla*_{CMY-2} que seja predominante, verificando-se maioritariamente uma combinação de disseminação clonal e de transferência horizontal através de plasmídeos específicos (sobretudo dos grupos de incompatibilidade IncA/C e IncII) (Baudry *et al.*, 2009; Carattoli A, 2009).

Alguns genes do tipo *bla*_{CMY-2} como *bla*_{CMY-3}, -4, -12, -15, -16, têm como particularidade terem sido detectados no cromossoma de *P. mirabilis* e não em plasmídeos, sugerindo uma possível transferência de cromossoma a cromossoma entre *C. freundii* e *P. mirabilis* (Bret *et al.*, 1998; D'Andrea *et al.*, 2006; Literacka *et al.*, 2004). Esta hipótese é suportada pelos achados de Harada *et al.* (2010), que determinaram a presença do gene *bla*_{CMY-2} inserido num transposão composto, que por sua vez estava integrado num elemento integrativo conjugativo (ICEs, *Integrating Conjugative Elements*) do tipo SXT/R391 no cromossoma de *P. mirabilis*. Os ICEs são elementos genéticos móveis com capacidade de mobilização entre o cromossoma de um hospedeiro e o cromossoma de um novo hospedeiro, através de processos de excisão, conjugação e integração (Wozniak *et al.*, 2009). A integração cromossómica de *bla*_{CMY-2} também já foi verificada noutras espécies, nomeadamente em *E. coli*, e *K. pneumoniae* na Noruega e Grécia, respectivamente (Naseer *et al.*, 2010; Papagiannitsis *et al.*, 2010). Por outro lado, sequências de inserção do tipo *ISEcp1* têm sido detectadas frequentemente a montante de genes do tipo *bla*_{CMY-2}, e que estarão presumivelmente

envolvidas na sua mobilização e expressão (Barlow *et al.*, 2002; Verdet *et al.*, 2009; Zioga *et al.*, 2009). A maioria destes genes tem como provável origem mutações pontuais em *bla*_{CMY-2}, hipótese que é reforçada pelo ambiente genético similar em que têm sido descritas (*bla*_{qAmpC}, *blc*, *sugE*).

O estudo da organização genética de *bla*_{CFE-1} por Nakano *et al.* (2004) demonstrou que este gene foi translocado do cromossoma da estirpe *C. freundii* GC3 para um plasmídeo pela acção da sequência de inserção IS26, sendo posteriormente transferido para *E. coli*. Uma organização similar foi descrita para *bla*_{CMY-13} também em *E. coli* (Miriagou *et al.*, 2004). Por outro lado, *bla*_{LAT-1} que foi detectado num plasmídeo mobilizável, apresenta elevada homologia com o gene *bla*_{AmpC} natural da estirpe *C. freundii* OS60 (Tzouveleki *et al.*, 1994), supondo-se por isso que o ambiente genético envolvente seja similar a genes do tipo *bla*_{CMY-2}.

3.2.2.2.3. *qAmpC* do tipo ACT e MIR

Apesar de já terem sido descritas nove variantes de enzimas do tipo ACT (8 *qAmpC*) e cinco do tipo MIR (3 *qAmpC*) (<http://www.lahey.org/studies/>), a sua ocorrência é muito baixa quando comparada com as variantes do tipo CMY-2, estando restritas a *K. pneumoniae* e *E. coli*, sendo detectadas principalmente nos EUA e Sudeste Asiático (Alvarez *et al.*, 2004; Coudron *et al.*, 2003; Papanicolaou *et al.*, 1990; Song *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Manageiro *et al.* (2010) detectaram em Portugal cinco isolados produtores de enzimas do tipo MIR e um do tipo ACT, em *Enterobacteriaceae* desprovidas de AmpC cromossómica indutível (não havendo indicação da variante e da espécie).

De acordo com Alvarez *et al.* (2004), estudos de tipagem bacteriana (PFGE) demonstraram que uma única estirpe de *K. pneumoniae* foi responsável pela disseminação de genes *bla*_{ACT-1} na área de Nova Iorque. Papanicolaou e colaboradores (1990) sugeriram a propagação do gene *bla*_{MIR-1} à sua presença num plasmídeo do tipo IncN que posteriormente foi transferido entre isolados de *K. pneumoniae*.

Devido à elevada similaridade (99%), ACT-2 e ACT-3 deverão ter evoluído a partir de ACT-1 através da acumulação de mutações pontuais, que se traduzem apenas

na alteração de um aminoácido de cada enzima. Por outro lado, deleções e inserções, além de mutações pontuais, parecem ter contribuído para a emergência de ACT-4, ACT-5, ACT-6 e ACT-7 (com base na análise das sequências nucleotídicas com ClustalW). As enzimas do tipo MIR apresentam também elevada similaridade entre si (99%), reflexo de uma evolução por acumulação de mutações pontuais.

Como referido anteriormente, a produção da enzima ACT-1 é indutível por certos antibióticos β -lactâmicos, dado que *bla*_{ACT-1} se encontra adjacente ao gene *ampR* (o qual está a montante de *bla*_{ACT-1}), sendo no entanto transcritos de forma divergente (Reisbig *et al.*, 2002). Song *et al.* (2010), descreveram recentemente a presença de *bla*_{ACT-3} em *Enterobacter asburiae* num ambiente genético similar ao observado para as qAmpC do tipo CMY-2, com a presença a jusante dos genes *blc* e *sugE*, embora sem *ISEcp1* a montante, cujo lugar está ocupado por *ampR* (número de acesso *GenBank* EU427302.2; Philippon *et al.*, 2002). O gene *bla*_{MIR-1} foi localizado junto a uma sequência de inserção, a qual poderá ter estado envolvida na sua mobilização, embora os estudos efectuados para demonstrar esta possibilidade não tenham tido sucesso (Jacoby *et al.*, 1999).

3.2.2.2.4. qAmpC do tipo DHA

Actualmente estão descritas oito variantes de enzimas do tipo DHA (<http://www.lahey.org/studies/>), sendo DHA-1 a única detectada consistentemente na globalidade dos estudos, constituindo-se actualmente como a segunda qAmpC mais prevalente (a seguir a CMY-2) (Ogbolu *et al.*, 2011; Singtohin *et al.*, 2010; Yamasaki *et al.*, 2010). Assim como as restantes qAmpCs, as enzimas do tipo DHA estão principalmente distribuídas entre as *Enterobacteriaceae*, com especial associação a *K. pneumoniae*, sendo a maioria dos estudos envolvendo DHA-1 provenientes do Sudeste Asiático e Europa (Diestra *et al.*, 2010; Empel *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2010). Ferreira *et al.* (2009) e Manageiro *et al.* (2010) detectaram em Portugal a presença de genes *bla*_{DHA-1} em *K. pneumoniae* (5 e 52 isolados, respectivamente). No entanto, no primeiro estudo apenas se incluiu um hospital e a prevalência de *bla*_{CMY-2} foi superior (*C. freundii*), ao contrário do último caso que envolveu vários hospitais e se detectou uma maior ocorrência de *bla*_{DHA-1}.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a contribuição da disseminação clonal e também da transferência horizontal de plamídeos na disseminação de genes *bla*_{DHA-1}, tendo-se verificado a sua localização em plasmídeos transferíveis pertencentes aos grupos de incompatibilidade IncL/M, FII e FIA (Diestra *et al.*, 2010; Hopkins *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006a). Por outro lado, alguns estudos demonstram a localização dos genes *bla*_{DHA-2} e *bla*_{DHA-3} em plasmídeos não transferíveis (Fortineau *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005)

Entre as qAmpC do tipo DHA apenas se conhece as sequências nucleotídicas das enzimas DHA-1, -2, -3, -6 e -7, verificando-se uma homologia de 99% entre DHA-1, -3, -6 e -7, e de 96% entre estas e DHA-2, como resultado da acumulação de mutações pontuais (Fortineau *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005).

O estudo da organização genética em torno de *bla*_{DHA-1} tem permitido verificar a sua presença frequente em integrões compostos de classe 1 (com duplicação da região conservada 3'CS), para os quais são usualmente mobilizados por *ISCR1*, junto à qual se encontra por vezes adjacente (número de acesso *GenBank* GU723681.1; Verdet *et al.*, 2006). Os mesmos autores sugerem ainda que o gene *bla*_{DHA-1} presente no plasmídeo pTN60013 faz parte de um transposição composto flanqueado por duas cópias de IS26. Este tipo de organização genética também foi verificado por Ho *et al.* (2011) no plasmídeo de *E. coli* pNDM-HK, que codifica também o gene *bla*_{NDM-1} e que se encontra separado de *bla*_{DHA-1} apenas pelo gene *trpF*.

Recentemente, Mata *et al.* (2011) também detectaram *bla*_{DHA-1} em *E. coli* e *Klebsiella* spp. contendo *bla*_{NDM-1}, mas neste caso o gene encontra-se codificado no cromossoma. Os autores demonstraram a mobilização de *bla*_{DHA-1} de cromossoma a cromossoma, situação que é consistente com a presença de ICES, mas não as do tipo SXT. Quanto à organização genética de *bla*_{DHA-2} e *bla*_{DHA-3} esta não se encontra até ao momento estudada em detalhe.

3.2.2.2.5. qAmpC do tipo ACC

Entre as quatro variantes de enzimas do tipo ACC descritas, apenas ACC-1 e -4

(<http://www.lahey.org/studies/>), se detectaram fora do hospedeiro natural. ACC-1 é a mais frequentemente detectada em isolados clínicos, incluindo *Salmonella* spp., *E. coli* e *K. pneumoniae*, provenientes exclusivamente de países Europeus e do Norte de África (Ktari *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2008). A sua prevalência é muito baixa quando comparada com CMY-2 e DHA-1 (Mata *et al.*, 2010) e em Portugal ainda não foram detectadas.

A disseminação clonal, assim como a transferência horizontal de plasmídeos têm contribuído para a propagação de genes *bla*_{ACC-1} (Ktari *et al.*, 2009; Ruppé *et al.*, 2006), tendo-se verificado inclusive um caso de transferência *in vivo* entre um isolado de *K. pneumoniae* e uma *E. coli* numa criança Tunisina (Bidet *et al.*, 2005). Quanto a *bla*_{ACC-4}, os dois trabalhos existentes na literatura referem a sua detecção num plasmídeo conjugativo de *E. coli* (Grécia) e em plasmídeos não transferíveis de *P. mirabilis* (Hungria) (Damjanova *et al.*, 2009; Papagiannitsis *et al.*, 2007).

Apenas se conhece a sequência completa de três (ACC-1, ACC-2, ACC-4) das quatro variantes, verificando-se uma similaridade superior a 95%. ACC-4, por exemplo, apresenta uma única mutação pontual relativamente a ACC-1 (Papagiannitsis *et al.*, 2007), enquanto ACC-2 possui uma inserção de treze nucleótidos no início da sequência, para além de várias mutações pontuais ao longo do gene, sendo por isso a AmpC com maior número de aminoácidos constituintes entre todas as AmpCs descritas (Girlich *et al.*, 2000).

Como demonstrado por Doloy *et al.* (2006), o ambiente genético de *bla*_{ACC-1} é bastante complexo, envolvendo a presença a montante de *ISEcp1* nos catorze isolados de *Enterobacteriaceae* estudados de vários países, revelando o seu provável envolvimento na mobilização de *bla*_{ACC-1} e do gene *gdha* (que codifica para uma glutamato desidrogenase) do cromossoma de *H. alvei* para um plasmídeo. A estes eventos ter-se-ão sucedido outros envolvendo IS26, transposões (particularmente Tn1696) e a associação a integrões de classe 1. Papagiannitsis *et al.* (2007) descreveram uma organização genética similar envolvendo *bla*_{ACC-4}, o que suporta a sua origem a partir de *bla*_{ACC-1}. Apesar de pouco detalhado, o ambiente genético de *bla*_{ACC-2} (apenas detectada no hospedeiro natural) é diferente, caracterizando-se pela presença do gene

ampR a montante, uma situação usual para as AmpC cromossômicas (Girlich *et al.*, 2000).

3.2.2.2.6. Distribuição global das qAmpC

O mapa que se segue (Figura 4) permite visualizar de uma forma mais simples a distribuição e prevalência em diferentes regiões do Mundo das diferentes qAmpC. Os dados representam percentagens da ocorrência absoluta de cada tipo de qAmpC em estudos nacionais e internacionais, obtidas em hospitais específicos ou multicentro, exclusivamente de isolados clínicos. A maioria dos estudos de suporte encontra-se já referenciada na revisão bibliográfica, citando-se de seguida os respeitantes apenas a esta figura (Bell *et al.*, 2007; Jørgensen *et al.*, 2010; Kruger *et al.*, 2004; Luzzaro *et al.*, 2009; Migliavacca *et al.*, 2007; Miriagou *et al.*, 2002; Mocktar *et al.*, Mulvey *et al.*, 2005; Pavez *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2007; Smet *et al.*, 2008; Usha *et al.*, 2008; Vanwynsberghe *et al.*, 2007; Voets *et al.*, 2011).

3.2.2.3. Relevância clínica

Dada a emergência e rápida disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC, vários surtos nosocomiais têm sido descritos recentemente, envolvendo na sua grande parte isolados produtores de CMY-2, DHA-1 e, esporadicamente, ACC-1, esta última afectando raramente mais de dez indivíduos (Huang *et al.*, 2005; Ktari *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2008). Contudo, Ohana *et al.* (2005) reportaram a ocorrência de um largo surto hospitalar em França, detectando-se a disseminação da estirpe epidémica (uma *K. pneumoniae* produtora de ACC-1) durante um período de 4 anos, afectando 57 pacientes, dos quais 19 com infecção confirmada (os restantes apresentavam colonização). A análise epidemiológica permitiu concluir que a estirpe fora importada da Tunísia através da admissão de um paciente com tetraplágia. Recentemente, genes *bla*_{CMY-2} têm sido detectados em isolados clínicos pertencendo ao clone pandémico ST131, o qual tem estado predominantemente associado à disseminação de *bla*_{CTX-M-15} (Simner *et al.*, 2011).

Os factores de risco associados a infecções por isolados produtores de qAmpC são similares aos definidos para infecções por bactérias produtoras de ESBLs, incluindo estadia hospitalar prolongada, tratamento em unidades de cuidados intensivos, presença

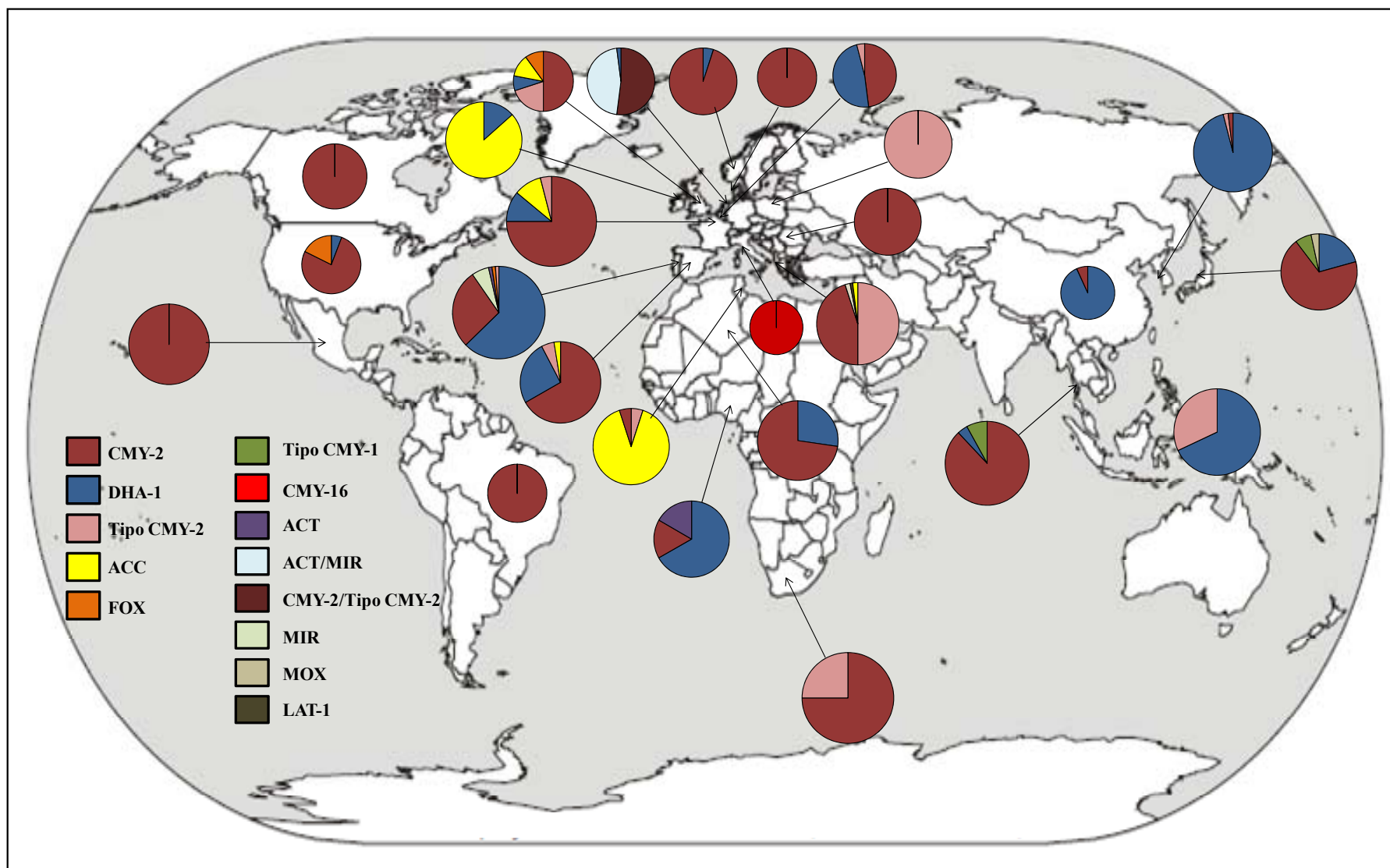


Figura 4. Distribuição global das qAmpC.

de cateter venoso central ou algália e terapêutica prévia com antibióticos, especialmente com cefalosporinas de largo espectro e antibióticos inibidores das β -lactamases (Jacoby, 2009). Usualmente estes pacientes apresentam como características terem sido sujeitos a um ou mais procedimentos cirúrgicos, e/ou possuírem doenças subjacentes como cancro, imunodepressão pós-transplante e também diabetes (Philippon *et al.*, 2002; Sidjabat *et al.*, 2009). Os resultados de Park *et al.* (2009) indicam que o uso prévio (no espaço de um mês) de uma oximinocefalosporina é um factor de risco independente para a aquisição de infecção por *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC, e que esta constitui um factor de risco independente para que ocorra um resultado desfavorável, provavelmente devido a terapia inicial inapropriada.

Devido à característica multiresistência aos antibióticos das *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC e a frequente co-produção de ESBLs, a selecção de terapêutica antibiótica está limitada a poucas opções. Alguns estudos de susceptibilidade realizados indicam que as alternativas mais apropriadas são a cefepima (cefalosporina de quarta geração), o imipenemo, a tigeciclina e a colistina (Song *et al.*, 2006; Woodford *et al.*, 2007). Contudo, apesar da cefepima aparentar ser mais estável frente a algumas ESBLs e muito estável relativamente às enzimas AmpC (fraco indutor, rápida penetração através dos canais de porina da membrana externa), existe pouca informação disponível sobre a sua eficácia no tratamento de infecções provocadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC (Giamarellou, 2008). O estudo *in vitro* do efeito de inóculos bacterianos superiores aos usados nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, demonstrou que a actividade da cefepima deixa de ser eficaz nessas condições (Kang *et al.*, 2004). Acresce o facto de já terem sido descritas ESBLs (variantes CTX-M) e AmpCs (CMY-19, CMY-37) capazes de hidrolizar a cefepima (Ahmed *et al.*, 2008; Giamarellou, 2008; Wachino *et al.*, 2006).

Os carbapenemos são habitualmente a primeira escolha para a terapia de infecções por isolados produtores de qAmpC, especificamente o imipenemo e o meropenemo, devido à superior actividade *in vitro* (na globalidade dos estudos, a susceptibilidade ao imipenemo é de aproximadamente 100%), e à experiência clínica favorável (Jones *et al.*, 2009; Woodford *et al.*, 2007; Yang e Guglielmo, 2007). Quando ocorre, a resistência clínica aos carbapenemos tem envolvido a presença concomitante

de outros mecanismos de resistência, como a perda de porinas (OmpK36 em *K. pneumoniae* e OmpF/OmpC em *E. coli*) ou a produção de uma metalo- β -lactamase (VIM-4, VIM-19) (Colinon *et al.*, 2007; Cuzon *et al.*, 2010; Oteo *et al.*, 2008; Pournaras *et al.*, 2010). Contudo, como referido anteriormente algumas qAmpC exibem eficiência catalítica frente a carbapenemos, podendo promover a emergência de resistência em isolados com perda de porinas (Mammeri *et al.*, 2010).

A tigeciclina, um derivado da minociclina e membro de uma nova classe de antibióticos denominada glicilciclina, tem também sido estudada no tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC. A evidência laboratorial e clínica têm demonstrado que mais de 90% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* são susceptíveis (Hope *et al.*, 2006; Kelesidis *et al.*, 2008). No entanto, ainda não existe consenso sobre que critérios de interpretação de susceptibilidade aplicar, existindo actualmente critérios propostos por três entidades, a FDA, o EUCAST e o CLSI (Hope *et al.*, 2010).

A emergência de estirpes com resistência múltipla entre as bactérias de Gram negativo tem levado a um renovado interesse no uso clínico da colistina, um antibiótico da família das polimixinas, que esteve em desuso durante algumas décadas devido a efeitos adversos (Falagas *et al.*, 2010). Embora não existam estudos clínicos direccionados a infecções por bactérias produtoras de qAmpC, Woodford *et al.* (2007) testaram *in vitro* 88 isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de enzimas do tipo CMY-2, ACC, FOX ou DHA, verificando que todos eram susceptíveis à colistina.

3.2.2.4. Detecção e caracterização de β -lactamases qAmpC

3.2.2.4.1. Métodos fenotípicos

A detecção de isolados bacterianos produtores de β -lactamases qAmpC é muito importante, dado o impacto que têm na escolha da terapêutica a usar. Portanto, em isolados de *Enterobacteriaceae* sem AmpC natural demonstrando resistência à cefoxitina, resistência ou susceptibilidade intermédia às cefalosporinas de largo espectro e às associações de β -lactâmicos com inibidores das β -lactamases e susceptibilidade à

cefepima deve suspeitar-se da presença de qAmpC (Doi e Paterson, 2007). Assim, infecções causadas por bactérias resistentes à cefoxitina e produtoras de enzimas do tipo qAmpC são usualmente tratadas com carbapenemos, enquanto infecções por bactérias resistentes à cefoxitina não produtoras de qAmpC poderão ser tratadas com cefalosporinas de largo espectro ou com carbapenemos (Coudron *et al.*, 2003).

Actualmente não existem critérios definidos pelo CLSI para a detecção fenotípica de qAmpC, embora eles existam para a detecção de ESBLs em *E. coli* e *K. pneumoniae* (CLSI, 2010) e os equipamentos automatizados ainda não produzem resultados consistentes (Fisher *et al.*, 2009). Contudo, a detecção de isolados produtores dos tipos de qAmpC que conferem resistência à cefoxitina pode ser efectuada recorrendo a vários métodos fenotípicos, entre os quais os testes tridimensionais, o teste AmpC em disco (*AmpC disk test*) e o teste do ácido borónico (PBA, *Phenylboronic Acid Test*).

Os testes tridimensionais foram inicialmente desenvolvidos para a detecção de ESBLs e mais tarde adaptados para a detecção de qAmpC, mas não são muito usados pois são tecnicamente laboriosos, envolvendo a obtenção de extractos enzimáticos (Coudron *et al.* 2000). O teste AmpC em disco (Figura 5) é menos laborioso, envolvendo a inoculação em meio Mueller-Hinton de uma estirpe controlo susceptível à cefoxitina, seguida da colocação de um disco de cefoxitina, ao lado do qual se coloca um disco contendo Tris-EDTA e carregado com colónias da estirpe a testar. O Tris-EDTA irá permeabilizar as células bacterianas e permitir a saída das β -lactamases. O teste é positivo se se verificar corte ou achatamento da zona de inibição da cefoxitina (Black *et al.*, 2005).

Dada a sua praticabilidade, o teste do ácido borónico (Figura 6) apresenta grande potencial para ser incluído na rotina laboratorial de um serviço de Microbiologia (Pitout *et al.*, 2010). Este teste baseia-se no facto do ácido fenilborónico (PBA) ser um inibidor natural das β -lactamases AmpC (Beesley *et al.*, 1983). Um resultado positivo corresponde a um aumento do halo de inibição ≥ 5 mm com o disco de cefotetan contendo PBA, comparativamente com um disco contendo unicamente cefotetan (Coudron *et al.*, 2005).

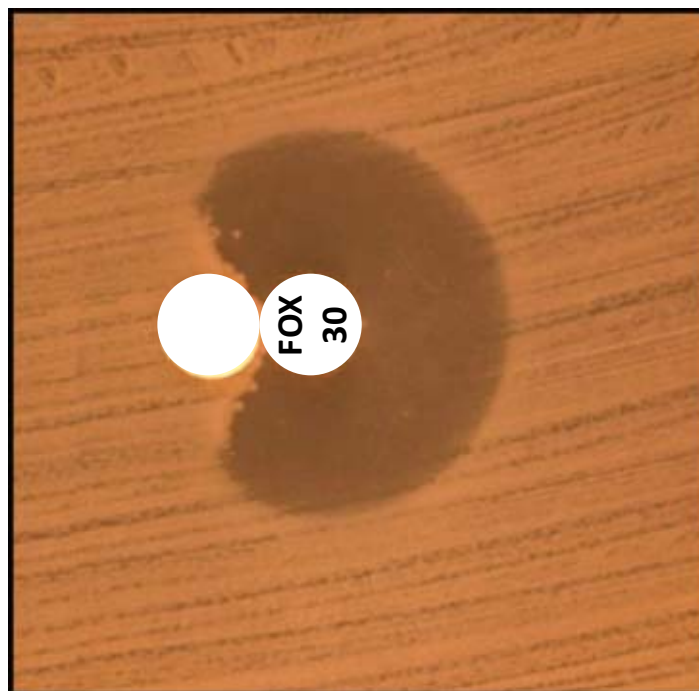


Figura 5. Teste AmpC em disco. O achatamento da zona de inibição demonstra um resultado positivo. O disco da esquerda contém Tris-EDTA e a bactéria teste (adaptado de Thomson, 2010).



Figura 6. *K. pneumoniae* apresentando um resultado positivo no teste do ácido borônico (CTT, cefotetan; PBA, ácido fenilborônico).

Para a detecção específica de qAmpCs do tipo ACC o teste tridimensional já provou a sua utilidade (Coudron, 2005), embora o teste PBA não permita essa detecção (Coudron, 2005, Pitout *et al.*, 2010). Ruppé *et al.* (2006) propuseram ainda a utilização de um teste de duplo sinergismo (*double disk synergy testing*) entre a cefoxitina e a ceftazidima ou a cefotaxima. O teste detecta as enzimas ACC independentemente da bactéria ser ou não produtora natural de AmpC. No entanto, a distância máxima entre os centros dos discos deverá ser de 20 mm para que se consiga visualizar o sinergismo (Figura 7).

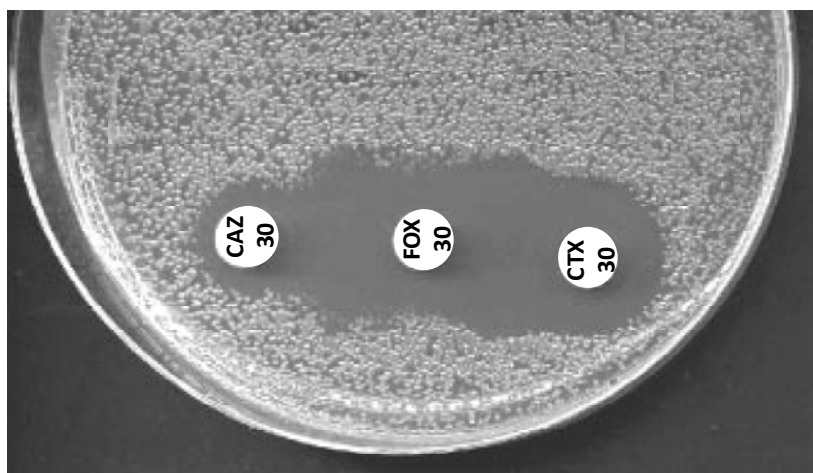


Figura 7. Detecção de enzimas qAmpC do tipo ACC pelo teste do duplo sinergismo (CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FOX, cefoxitina) (adaptado de Ruppé *et al.*, 2006).

3.2.2.4.2. Métodos genotípicos

A diferenciação dos diferentes grupos de qAmpC é importante por razões epidemiológicas e de controlo de infecção. Para tal, métodos genotípicos baseados na técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) têm sido desenvolvidos. Pérez-Pérez e Hanson (2002) desenvolveram o primeiro PCR *multiplex*, que consistia na utilização simultânea de seis pares de iniciadores ou *primers*. D'Andrea *et al.* (2006) utilizaram um esquema diferente, baseado na utilização de apenas quatro pares de *primers* para abranger os diferentes grupos de qAmpC. Os produtos de amplificação obtidos quando se usam os *primers* de D'Andrea *et al.* são maiores que os obtidos com o PCR *multiplex* de Pérez-Pérez e Hanson, sendo possível na maioria dos casos efectuar a sequenciação desses produtos para identificação do tipo de *bla*_{qAmpC} presente. Mais recentemente, Brolund *et al.* (2010) adaptaram esta

tecnologia ao ensaio de PCR em tempo real, com evidentes ganhos no tempo de trabalho. Contudo, estas técnicas estão apenas ao alcance de laboratórios de investigação de ponta com grandes recursos financeiros, não estando disponíveis na maioria dos hospitais.

3.2.2.5. Associação de bla_{qAmpC} a outros genes de resistência a antibióticos

A produção simultânea no mesmo isolado de $qAmpC$ e outras β -lactamases (ESBLs e/ou metalo- β -lactamases) contribuindo para a diminuição da susceptibilidade a diversos β -lactâmicos é também motivo de preocupação. Yoo *et al.* (2010) verificaram que 80% dos isolados de *E. coli* e 52% dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de $qAmpC$ produziam simultaneamente uma ESBL. DHA-1 e SHV-12 constituem um exemplo comum desta associação (Roh *et al.*, 2008). A presença de genes que codificam para $qAmpC$ e para outras β -lactamases numa mesma plataforma genética, nomeadamente em plasmídeos, tem sido apenas recentemente descrita, dos quais se citam os exemplos de bla_{DHA-1} e bla_{SHV-2a} (Corvec *et al.*, 2009), bla_{CMY-4} e bla_{VIM-4} (Colinon *et al.*, 2007; Ktari *et al.*, 2006), bla_{CMY-4} e bla_{NDM-1} (Yong *et al.*, 2009), bla_{DHA-1} e bla_{NDM-1} (Ho *et al.*, 2011) (Figura 8), e ainda bla_{CMY-2} e bla_{VIM-19} (Pournaras *et al.*, 2010).

As *Enterobacteriaceae* produtoras de $qAmpC$ são frequentemente co-resistentes a outras famílias de antibióticos (Philippon *et al.*, 2002), dado que os determinantes genéticos também se encontram frequentemente localizados na mesma plataforma genética (integrões, transposões e plasmídeos) contendo bla_{qAmpC} (Carattoli, 2009), como se pode constatar pelo exemplo do plasmídeo pNDM-HK (Figura 8).

Os resultados obtidos por Mata *et al.* (2010) num hospital espanhol, revelaram uma elevada resistência a antibióticos não- β -lactâmicos entre as *Enterobacteriaceae* produtoras de $qAmpC$, nomeadamente à tetraciclina (68%), sulfonamidas (62%), estreptomicina (52%), ciprofloxacina (51%) e cloranfenicol (44%). Num estudo realizado no Canadá, Mataseje *et al.* (2009a) verificaram que 25% dos isolados de *Salmonella* resistentes à cefoxitina apresentavam resistência múltipla, e ainda que 97% possuíam o gene bla_{CMY-2} , o qual em 20% dos isolados foi identificado em plasmídeos multiresistentes, a maioria pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncA/C.

modificadora de certas fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) foram também descritas (Corvec *et al.* 2009; Yang *et al.*, 2008).

3.2.2.6. Reservatórios de genes *bla*_{qAmpC}

Os animais que fazem parte da cadeia alimentar do Homem constituem um importante reservatório de agentes causadores de zoonoses, habitualmente por manuseamento impróprio ou confecção inadequada dos alimentos, e mais raramente por contacto directo (Carattoli, 2008). Vários autores têm também identificado estes animais como fonte de bactérias (comensais ou patogénicas) multiresistentes, fruto da administração de antibióticos a que estão sujeitos durante o seu desenvolvimento (Ahmed *et al.*, 2009; M'ikanatha *et al.*, 2010; Winokur *et al.*, 2000).

O número de estudos que sustentam a possibilidade de transmissão de genes *bla*_{qAmpC} através de produtos de origem animal é já bastante relevante. *bla*_{CMY-2} tem sido o gene mais frequentemente detectado (quase em exclusivo), particularmente em *Salmonella* spp. e *E. coli* isolados em carne de frangos, suínos e peru (Ahmed *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

Entre os animais de companhia, os cães parecem ser também um importante reservatório de genes *bla*_{qAmpC}, constituindo *bla*_{CMY-2} e *bla*_{CMY-7} os genes mais frequentes, encontrando-se associados maioritariamente a *E. coli* e *Salmonella* spp. (Carattoli *et al.*, 2005a; Frye *et al.*, 2007; Sidjabat *et al.*, 2006). No entanto, genes *bla*_{DHA-1} também já foram detectados em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de cães (Ma *et al.*, 2009). Por outro lado, genes *bla*_{qAmpC} não foram ainda detectados em animais selvagens.

Em trabalhos envolvendo amostras ambientais, particularmente águas para consumo humano (água potável) ou usadas em actividades recreativas (rios, mar), têm sido detectados isolados de *E. coli* resistentes à cefoxitina, alguns deles contendo os genes *bla*_{CMY-1} (1/22) e *bla*_{CMY-2} (110/142) (Kim *et al.*, 2008; Mataseje *et al.*, 2009).

Estudos de comparabilidade genética entre plasmídeos de *E. coli* e *Salmonella* spp. de diferentes origens (humanos, animais, ambiente) contendo *bla*_{CMY-2}, revelaram algumas semelhanças, sendo as replicões do tipo IncI1, IncA/C e IncK as mais frequentemente identificadas (Mataseje *et al.*, 2010). Este facto vem comprovar a fácil disseminação dos genes *bla*_{qAmpC} entre diferentes reservatórios, e a indissociabilidade entre as actividades do Homem e o ambiente que o rodeia, com todos os seus riscos e benefícios.

Concluindo, dada a fácil disseminação e o complexo ambiente genético em que se encontram os genes *bla*_{qAmpC}, assim como os nichos ecológicos ocupados e as implicações clínicas e terapêuticas decorrentes das infecções provocadas por bactérias produtoras de qAmpC, estas constituem actualmente um importante problema de Saúde Pública.

II. OBJECTIVOS

A detecção e a caracterização detalhada de β -lactamases qAmpC em diferentes *Enterobacteriaceae* tem sido pouco estudada, para isso contribuindo a dificuldade da sua detecção laboratorial quando existe co-produção de ESBLs, produção de AmpC natural ou perda/modificação de porinas. A relevância da disseminação plasmídica de *bla*_{qAmpC} em comparação com a dispersão clonal, assim como o papel de integrões, sequências de inserção, transposões e plasmídeos na sua permanência no meio hospitalar, também têm sido pouco documentadas. Em Portugal, a situação é também semelhante, existindo na sua maioria apenas relatos esporádicos em espécies particulares sobre a ocorrência e relevância clínica das qAmpC (Antunes *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009, Manageiro *et al.*, 2010).

Com o objectivo de avaliar a ocorrência, a diversidade e a epidemiologia de β -lactamases qAmpC em bactérias de origem clínica, será analisada uma colecção de isolados compreendendo espécies de *Enterobacteriaceae* desprovidas de AmpC indutível (nas quais as qAmpC têm sido mais frequentemente descritas) obtidas de doentes de diferentes hospitais Portugueses. Os objectivos específicos deste estudo são:

- 1) Avaliar o teste PBA na detecção de qAmpCs através da comparação com métodos genotípicos;
- 2) Investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para AmpC adquiridas (*bla*_{qAmpC}) em isolados de *Enterobacteriaceae* desprovidas de AmpC indutível de hospitais Portugueses durante um período de 7 anos (2002-2008);
- 3) Determinar diferenças espaciais (hospitais de localizações geográficas diferentes) e temporais (isolados bacterianos de diferentes períodos) na ocorrência de diferentes tipos de genes *bla*_{qAmpC};
- 4) Avaliar a co-produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e a co-resistência a antibióticos não- β -lactâmicos em isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de AmpC adquiridas;
- 5) Avaliar a contribuição da dispersão clonal e plasmídica (e eventualmente de integrões ou transposões) na disseminação e persistência de genes *bla*_{qAmpC}.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ISOLADOS BACTERIANOS

Foram incluídos no presente estudo 675 isolados clínicos pertencentes às espécies *Escherichia coli* (n=480) *Klebsiella pneumoniae* (n=141), *Klebsiella oxytoca* (n=27) e *Proteus mirabilis* (n=27), provenientes de amostras clínicas de pacientes de quatro hospitais Portugueses localizados na Zona Norte (Hospital A, HA, n=341) e Centro do País (Hospital B, HB, n=147; Hospital C, HC, n=15; Hospital D, HD, n=69), e de laboratórios da comunidade da Zona Norte (Laboratório E, LE, n=103) no período temporal 2002-2008. A identificação bacteriana efectuou-se por sistemas automáticos disponíveis naqueles hospitais e laboratórios. Em alguns isolados específicos recorreu-se a galerias API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) para confirmação da identificação. Os isolados incluídos neste estudo foram previamente caracterizados quanto ao conteúdo em ESBLs (Machado *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2009b).

2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

2.1. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

A avaliação preliminar da susceptibilidade aos antibióticos efectuou-se nos sistemas automáticos disponíveis nas instituições de saúde analisadas. Uma avaliação mais alargada da susceptibilidade de certos isolados bacterianos a antibióticos β -lactâmicos e não- β -lactâmicos foi posteriormente efectuada através do método de difusão em agar em meio Mueller-Hinton (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), utilizando discos (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) contendo os antibióticos a testar e seguindo as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2007). Os antibióticos avaliados foram: cefoxitina (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), cefepima (30 μ g), aztreonamo (30 μ g), amoxicilina-ácido clavulânico (30 μ g), imipenemo (10 μ g), meropenemo (10 μ g), ertapenemo (10 μ g), gentamicina (10 μ g), ampicacina (30 μ g), tobramicina (10 μ g), estreptomicina (10 μ g), netilmicina (30 μ g), canamicina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), ácido nalidíxico (30 μ g), sulfonamidas (300 μ g), trimetoprim (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g) e tigeciclina (15 μ g). Os resultados foram interpretados segundo os critérios do CLSI

(CLSI, 2007), excepto para o caso da tigeciclina, em que foram usados os critérios de interpretação do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2010). Na análise dos resultados consideraram-se como não susceptíveis isolados com comportamento de resistência (R) e de resistência intermédia (I).

2.2. Detecção da expressão de AmpCs

Isolados bacterianos com comportamento de resistência à cefoxitina (FOX^R) e de susceptibilidade intermédia ou resistência a oximinocefalosporinas (CEF^{I/R}) e a associações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases (AMC^{I/R}), foram identificados como presumíveis produtores de AmpC (Mirelis *et al.*, 2006; Pitout *et al.*, 2010). A confirmação fenotípica da expressão de AmpC foi posteriormente efectuada pelo teste PBA, usando a metodologia CLSI e discos de cefotetan (30 μ g) e ácido borónico-cefotetan (400 μ g / 30 μ g) em meio Mueller-Hinton (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (Pitout *et al.*, 2010; Coudron, 2005). Prepararam-se os discos da seguinte forma: 120mg de ácido fenilborónico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram dissolvidos em 3 mL de dimetilsulfóxido; adicionaram-se 3 mL de água destilada estéril para criar a solução *stock*; dispensaram-se 20 μ L da solução *stock* na superfície de discos brancos (desprovidos de qualquer composto) e dos discos de cefotetan; deixaram-se secar os discos ao ar durante 30 minutos, após os quais se usaram imediatamente.

O meio de cultura foi inoculado com as bactérias a testar usando a metodologia CLSI, seguindo-se a colocação dos discos e posterior incubação a 37°C durante 18-24 horas em atmosfera aeróbia. Como controlo negativo foi usada a *E. coli* ATCC 25922 e como controlos positivos a *Klebsiella pneumoniae* H427 (produtora de qAmpC e de ESBL) e a *E. coli* H330 (produtora de qAmpC, não produtora de ESBL).

A presença de enzimas qAmpC do tipo ACC foi investigada em isolados bacterianos susceptíveis à cefoxitina, resistentes a CEF e AMC, e não produtores de ESBL (Philippon *et al.*, 2002). A sua expressão foi avaliada pelo teste de duplo sinergismo (dois centímetros de centro a centro) usando metodologia CLSI e executada em meio Mueller-Hinton (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), visando detectar sinergismo entre a cefoxitina (30 μ g – colocada ao centro) e a ceftazidima (30 μ g) ou

cefotaxima (30 μ g) (Ruppé *et al.*, 2006). As condições de incubação foram as referidas para o teste PBA. Como controlo negativo foi usada a *E. coli* ATCC 25922.

3. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES *bla*_{qAmpC} E RESPECTIVO AMBIENTE GENÉTICO

3.1. *Extracção de DNA*

A partir de culturas bacterianas frescas obtidas em meio CLED (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suspenderam-se 4-5 colónias em 300 μ L de água ultrapura em tubo Eppendorf estéril. De seguida submeteu-se esta suspensão bacteriana a fervura em banho a 100°C durante 15 minutos. A suspensão resultante foi centrifugada a 14.000rpm durante 5 minutos, após a qual se recolheu o sobrenadante contendo o DNA bacteriano. Este foi congelado a -20°C para os estudos posteriores.

3.2. *Amplificação de genes *bla*_{qAmpC} por PCR*

Em todos os isolados bacterianos identificados como presumíveis produtores de qAmpC foi efectuada a detecção e caracterização molecular de genes *bla*_{qAmpC} através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Os *primers* e as condições de amplificação utilizados encontram-se na Tabela 4. Todas as reacções foram efectuadas num volume final de 25 μ L contendo *primers* (0.8 μ M), deoxinucleótidos (0.2 mM, Finnzymes, Espoo, Finlândia), MgCl₂ (1.0-1.5 mM), tampão da enzima (1X, Green GoTaq[®] Flexi Buffer), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase, Promega, Madison, EUA), aos quais se adicionou 2 μ L de DNA e água ultra-pura estéril para diluir os reagentes até à concentração final pretendida. Usaram-se os seguintes controlos positivos: *Aeromonas hydrophyla* R19 (AmpC/I), *Citrobacter freundii* A2 (AmpC/II), *Morganella morgannii* H411 (AmpC/III) e *Hafnia alvei* A15 (AmpC/IV). As reacções de amplificação realizaram-se nos termocicladores My Cycler[™] e ICycler[™] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

Tabela 4. Primers e condições de PCR usados para amplificação e sequenciação de genes *bla*_{qAmpC} e genes descritos no seu ambiente genético.

Primer	Sequência do primer (5' → 3')	Gene alvo	Tamanho do produto amplificado ^a	Condições de amplificação (°C/min)	Referência
AmpC/I_Fw AmpC/I_Rev	GATGGCAARGCCCACTAYTC TTGGCCAGCATGACGATG	<i>bla</i> _{CMY/MOX/FOX} ^b	917	D(94/5); D(94/1) A(64/1) E(72/1) x35; E(72/5)	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC/II_Fw AmpC/II_Rev	CAGGCYATTCCGGGTATGG GCCAGTTVAGCATYTCCCAG	<i>bla</i> _{CMY/LAT/ACT/MIR} ^c	763	D(94/5); D(94/1) A(64/1) E(72/1) x35; E(72/5)	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC/III_Fw AmpC/III_Rev	CATTAACCGCTGATGGCAC GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG	<i>bla</i> _{DHA/MOR}	1008	D(94/5); D(94/1) A(57/1) E(72/1) x35; E(72/5)	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
AmpC/IV_Fw AmpC/IV_Rev	AAGGTGCTCTGGCTGCTAATATC TTCCAATGAGCTCAGGATTTTAAAC	<i>bla</i> _{ACC}	1094	D(94/5); D(94/1) A(64/1) E(72/1) x35; E(72/5)	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
ampC1_F ^d ampC2_R ^d	ATGATGAAAAAATCGTTATGC TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	1143	D(94/10); D(94/1) A(60/1) E(72/1) x35; E(72/10)	Koeck <i>et al.</i> , 1997
ampC2_F2 ^e	CTCCAGCATTGGTCTGTTTGG	<i>bla</i> _{CMY-2-like}			Este estudo
AAC6'-A AAC6'-B	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	<i>aac(6')-Ib</i>	482	D(94/10); D(94/1) A(61/1) E(72/1) x35; E(72/10)	Minarini <i>et al.</i> , 2008
OXAIII-F OXAIII-R	TTTTCTGTGTTTGGGTTTT TTTCTTGGCTTTTATGCTTG	<i>bla</i> _{OXA-III}	447	D(94/10); D(94/1) A(54/1) E(72/1) x35; E(72/10)	Bert <i>et al.</i> , 2002
catout3'-1F arr3out5'-1R	TTTCTGCTCTATCGGGAG TTGTTAGACGGCAAACCTC	<i>catB</i>	454	D(94/10); D(94/0,5) A(52/0,5) E(72/1) x35; E(72/10)	Quiroga <i>et al.</i> , 2007
arr-2F arr-2B	AATTACAAGCAGGTGCAAGGA TTCAATGACGTGTAAACCACG	<i>arr</i>	414	D(94/10); D(94/0,5) A(59/0,5) E(72/1) x35; E(72/10)	Mammeri <i>et al.</i> , 2005
Sul1-F Sul1-B	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	<i>sul1</i>	433	D(94/10); D(94/0,5) A(66/0,5) E(72/1) x30; E(72/10)	Kern <i>et al.</i> , 2002

Tabela 4. Continuação.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Gene alvo	Tamanho do produto amplificado ^a	Condições de amplificação	Referência
qnrBm-F qnrBm-R	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCGYYCGCCAGTCGAA	<i>qnrB</i>	263	D(94/10); D(94/1) A(57/1) E(72/1) x35; E(72/10)	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
ORF513-1 ORF513-R	GTGGGATGGTGCAGAGCTC CTCGCTTGAGGCGTTGCAT	<i>ISCR1</i>	1600	D(94/10); D(94/0,5) A(60/0,5) E(72/1) x30; E(72/10)	Este estudo Novais <i>et al.</i> , 2006
IS26F IS26R	AGCGTGACATCATTCTGTGG ACCTTTGATGGTGGCGTAAG	IS26	575	D(94/10); D(94/0,5) A(60/0,5) E(72/1) x35; E(72/10)	Este estudo
ISECP1-F ISECP1-R	ATCTAACATCAAATGCAGG AGACTGCTTCTCACACAT	<i>ISEcp1</i>	1381	D(94/10); D(94/1) A(59/1) E(72/5) x35; E(72/10)	Machado <i>et al.</i> , 2004
finQ_F finQ_R	TCAAGGAACTCCCTTCATGG CCACCGGTAGTTGTTTACG	<i>finQ</i>	705	D(94/10); D(94/1) A(60/1) E(72/1) x35; E(72/10)	Este estudo
blc_F blc-Rev	TTGATGCCAAACGCTATCTG TTAAGCGCGGCTCTGCTTG	<i>blc</i>	214	D(94/10); D(94/1) A(60/0,5) E(72/1) x35; E(72/10)	Este estudo D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
INT1_F INT1_R	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG ACATGCGTGTAATCATCGTCG	<i>Integrase classe 1</i>	484	D(94/10); D(94/0,5) A(62/0,5) E(72/1) x30; E(72/10)	Mazel <i>et al.</i> , 2000
5'CS 3'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	<i>Cassettes de genes inseridas</i>	Variável	D(94/10); D(94/1) A(53/1) E(72/7) x35; E(72/16)	Lévesque <i>et al.</i> , 1995

^aPares de bases; ^bAmplificação de genes do tipo *bla*_{CMY-1}; ^cAmplificação de genes do tipo *bla*_{CMY-2} podendo também amplificar a AmpC cromossômica de certas espécies de *Enterobacteriaceae* (ex: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *E. coli*); ^dPrimers usados para amplificação e sequenciação do gene completo; ^ePrimer usado apenas para sequenciação; D, desnaturação; A, annealing; E, extensão.

3.3. Estudo do ambiente genético de *bla*_{qAmpC} por PCR

A presença de genes que têm vindo a ser descritos no ambiente genético de *bla*_{qAmpC} foi também investigada pela técnica de PCR. Para isso utilizaram-se *primers* específicos para detecção de *aac(6')-Ib*, *bla*_{OXA}, *catB*, *arr*, *sull1*, *qnrB*, *ISCRI*, *IS26*, *ISEcp1*, *blc* e *finQ* (Tabela 4). Para a detecção e caracterização de integrões de classe 1 foram usados dois pares de *primers*: i) *Int1-F* e *Int1-R* para amplificar o gene da integrase (*intI1*) e ii) 5'CS e 3'CS para amplificar a região variável compreendida entre as sequências conservadas 5'CS e 3'CS, habitualmente contendo cassetes de genes conferindo resistência a antibióticos, (incluindo *bla*_{qAmpC}) (Machado *et al.*, 2005) (Tabela 4). As condições usadas na preparação das reacções de PCR foram as descritas na secção 3.2 excepto nas concentrações de MgCl₂ (1.0-2.5 mM).

A organização genética em torno de *bla*_{qAmpC} foi posteriormente estabelecida por PCR *mapping* e sequenciação (Figura 12), utilizando-se para o efeito os *primers* incluídos na Tabela 5 e uma *Taq* DNA Polimerase com capacidade de amplificação de fragmentos de elevado peso molecular (TaKara LA Taq, TaKara Bio Inc, Otsu, Japão). As reacções foram efectuadas em volume final de 25 μ L, contendo *primers* (0.1 μ M), deoxinucleótidos (0.2 mM, Finnzymes, Espoo, Finlândia), MgCl₂ (1.0-2.5 mM), tampão da enzima (0.5X, LA Buffer II), 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (TaKara LA Taq, TaKara Bio Inc, Otsu, Japão), aos quais se adicionou 2 μ L de DNA e água ultra-pura estéril para diluir os reagentes até à concentração final pretendida. As condições de amplificação dependeram da combinação de *primers* usados e do tamanho do fragmento esperado.

3.4. Electroforese

Dependendo do tamanho esperado, os produtos amplificados (7 μ L) foram analisados através de electroforese em gel de agarose a 1,0-1,5% em TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA), contendo 0,1 μ L/mL de SYBR SafeTM DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisly, Reino Unido) como composto fluorescente intercalador de ácidos nucleicos, de forma a ser possível a visualização dos produtos amplificados sob luz UV de um transiluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As condições de electroforese foram as seguintes: 100V, 35 minutos, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV em transiluminador acoplado ao sistema de aquisição de imagem *Molecular Imager ChemiDoc^{XRS}* (Milão, Itália), que conjuntamente com o programa *Quantity*

Tabela 5. Primers usados para PCR *mapping*.

Nº	Primer	Sequência do primer (5' → 3')	Nº Acesso GenBank	Posições	Referência
1	AAC6'-A	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	GU943791	1560–1582	Minarini <i>et al.</i> , 2008
2	arr-2B	TTCAATGACGTGTAAACCACG	GU943791	4324–4304	Mammeri <i>et al.</i> , 2005
3	arr-2F	AATTACAAGCAGGTGCAAGGA	GU943791	3911–3931	Mammeri <i>et al.</i> , 2005
4	ORF513-R	CTCGCTTGAGGCGTTGCAT	GU943791	7461–7443	Novais <i>et al.</i> , 2006
5	qacE Δ 2_F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	GU943791	4577–4596	Novais <i>et al.</i> , 2006
6	qnrBm-R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA	GU943791	14587–14606	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
7	pspA-Rv	CAACATCAATGCCTGCTGAC	GU943791	16745–16726	Verdet <i>et al.</i> , 2006
8	pspD-Fw	CCGGCAATCAGGCTAAATAA	GU943791	18121–18140	Verdet <i>et al.</i> , 2006
9	qacE Δ 1B	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	GU943791	21843–21824	Novais <i>et al.</i> , 2006
10	INT1_R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG	GU943791	273–294	Mazel <i>et al.</i> , 2000
11	AAC6'-B	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	GU943791	2041–2022	Minarini <i>et al.</i> , 2008
16	ORF513_Fr	ATGCAACGCCTCAAGCGAG	GU943791	7461–7443	Este estudo
17	ORF513-1	GTGGGATGGTGCAGAGCTC	GU943791	5862–5880	Este estudo
18	AmpC/III_Fr	CGAATACCGAAAGAGTCAAAGC	GU943791	19271–19250	Este estudo
19	AmpC/III_Fw	CATTAAACCGCTGATGGCAC	GU943791	20238–20257	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
20	OXAIII-F	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT	GU943791	2541–2560	Bert <i>et al.</i> , 2002
21	catout3'-1F	TTTCTGCTCTATCGGGAG	GU943791	3343–3360	Quiroga <i>et al.</i> , 2007
22	qnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	GU943791	14830–14849	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
23	ampC2_F2	CTCCAGCATTGGTCTGTTTGG	GQ398239	2866–2886	Este estudo
24	ampC2_R	TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	GQ398239	3493–3472	Koeck <i>et al.</i> , 1997
25	ISECP1_R_Fw	ATCTAACATCAAATGCAGG	GQ398239	2159–2176	Este Estudo
26	blc-Rev	TTAAGCGCGGCTCTGCTTG	GQ398239	3903–3885	D' Andrea <i>et al.</i> , 2006
27	blc_F	TTGATGCCAAACGCTATCTG	GQ398239	3690–3709	Este estudo
28	finQ_F_R	CCATGAAGGGAGTTCCTT	GQ398239	4707–4690	Este estudo

One version 4.6.1 Build 055 (Bio-Rad, Hércules, EUA) permitiu guardar um registo dos resultados obtidos. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com os marcadores de peso molecular HyperLadder™ IV (Biolone, Uppsala, Suécia), ou GeneRuler™ DNA Ladder MIX (Fermentas, Burlington, Canada), dependendo do tamanho esperado.

3.5. Purificação dos produtos de PCR

Quando apropriado procedeu-se à purificação dos produtos de PCR utilizando o sistema de purificação *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para avaliar a qualidade da purificação efectuada, realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 2%, de acordo com a secção 3.4.

3.6. Sequenciação

As reacções de sequenciação dos produtos de PCR purificados foram efectuadas pela empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal) em sequenciador automático *3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), utilizando-se os *primers* usados nas reacções de PCR ou *primers* especificamente sintetizados para a obtenção de sequências completas dos fragmentos de amplificação obtidos durante as estratégias de PCR *mapping* (Tabela 4, Tabela 5).

A análise e edição das sequências nucleotídicas e proteicas efectuaram-se com recurso ao programa Chromas versão 2.33 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Austrália). Posteriormente compararam-se com sequências depositadas em bancos de dados genéticos mundiais como o *GenBank*, usando os programas *Blastn suite* ou *Blastp suite*, respectivamente. A análise da semelhança entre múltiplas sequências genéticas foi realizada usando a ferramenta *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4. ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *KLEBSIELLA* SPP. E *E. COLI* PRODUTORES DE qAmpC

A identificação de clones ou de grupos clonais (isolados geneticamente relacionados, indistinguíveis ou muito similares através de testes genéticos, que se presume derivarem do mesmo progenitor) entre os isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de qAmpC foi feita recorrendo às técnicas de Electroforese em Campo Pulsado (PFGE) e *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). A estrutura populacional de *E. coli* produtoras de qAmpC foi ainda avaliada através da determinação de grupos filogenéticos.

4.1. *Electroforese em Campo Pulsado (PFGE)*

Esta técnica foi utilizada para a análise clonal de todos os isolados produtores de qAmpC. A preparação de moldes de agarose contendo as células bacterianas incorporadas (*plugs*) e a subsequente extração de DNA genómico *in situ*, decorreram segundo o protocolo de Gautom (1997).

Resumidamente, inoculou-se uma colónia bacteriana em caldo Luria-Bertani (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) que se deixou incubar a 37°C não mais de 16 horas. Centrifugaram-se as culturas obtidas a 13.000rpm durante 10 minutos, e de seguida ressuspenderam-se as bactérias em 1 mL de tampão TE (Tris-EDTA). Procedeu-se a nova centrifugação seguida de ressuspensão em 500 μ L de tampão TE. Posteriormente as suspensões bacterianas foram incorporadas em moldes de agarose a 1.6%. Procedeu-se à lise bacteriana e à desproteínização de cada *plug* utilizando-se 1 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8.0; 1% N-lauryl-sarkosine; 0.1 mg/mL proteinase K) em banho com agitação a 54°C, durante 18 horas. Para a digestão do DNA genómico *in situ*, uma pequena porção do *plug* preparado (1 mm de largura) foi sujeita à acção da enzima de restrição *XbaI* (40 U) (New England Biolabs, Ipswich, EUA), em 100 μ L de solução contendo tampão NE 1X, BSA a 100 μ g/mL e água ultra-pura, em banho a 37°C durante 18 horas (Machado *et al.*, 2005). Os fragmentos de DNA obtidos foram separados por electroforese em corrente alternada ou em campo pulsado em gel de agarose Seakem[®] Gold (Lonza, Rockland, EUA) a 1.2% em tampão TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA), utilizando-se o equipamento CHEF-DR[®]III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) e as seguintes condições de electroforese: 14°C a 6 V/cm durante 21 h, com tempo de pulsos variando entre 10

segundos e 40 segundos (10-40s). O marcador de peso molecular utilizado foi o *Lambda Ladder PFG marker* (48.5-1,018.5 kb) (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Após electroforese, o gel resultante foi corado com uma solução de brometo de etídio (0.2 μ g/mL) durante 30 minutos, seguindo-se uma lavagem com água destilada durante 10 minutos. De seguida foi exposto à luz UV em transiluminador acoplado ao sistema de aquisição de imagem *Molecular Imager ChemiDoc^{XRS}* (Milão, Itália). Os perfis obtidos foram analisados visualmente, aplicando-se os critérios de Tenover *et al.* (2005) na avaliação da relação clonal.

4.2. Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Em isolados representantes de clones de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtores de qAmpC (identificados por PFGE), foi ainda utilizada a técnica de MLST para identificar sequências tipo (ST) prevalentes. Esta técnica consiste na amplificação por PCR e sequenciação de fragmentos internos de genes cromossómicos que codificam para a manutenção de funções celulares básicas (genes *housekeeping*) de modo a detectar variantes alélicas que definem clones ou linhagens clonais. O PCR para *K. pneumoniae* consta na amplificação de sete genes (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* e *tonB*) como descrito por Diancourt *et al.* (2005). Os *primers* e condições de amplificação foram os especificados para o protocolo 2 publicado no sítio Web (http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Kpneumoniae.html). O PCR para *E. coli* consta também na amplificação de sete genes (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*) como descrito por Wirth *et al.* (2006). Os *primers* e condições de amplificação foram as especificadas no sítio Web (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html). A purificação dos produtos de PCR foi efectuada como descrito anteriormente (ponto 3.5). Para a sequenciação recorreu-se aos *primers* especificados nos protocolos respectivos. A análise e edição das sequências nucleotídicas e proteicas efectuaram-se com recurso ao programa Chromas versão 2.33 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Austrália). As sequências obtidas para cada um dos sete alelos foram comparadas com as disponíveis nas respectivas bases de dados. Para cada isolado foi obtido um perfil de sete números correspondentes às variantes de cada um dos alelos, o qual permitiu identificar o ST correspondente.

4.3. Determinação de grupos filogenéticos de *E. coli*

De modo a estabelecer os grupos filogenéticos correspondentes a cada isolado de *E. coli*, utilizou-se a técnica de PCR para amplificar dois genes (*chuA* e *yjaA*) e o fragmento de DNA TSPE4.C2, como descrito por Clermont *et al.* (2000). Os fragmentos obtidos definem quatro grupos filogenéticos distintos: A (ausência de *chuA* e TSPE4.C2); B1 (ausência de *chuA* e presença de TSPE4.C2); B2 (presença de *chuA* e *yjaA*); D (presença de *chuA*, ausência de *yjaA*).

5. ANÁLISE DA TRANSFERIBILIDADE DE *bla*_{qAmpC}

A capacidade de transferência de *bla*_{qAmpC} foi avaliada *in vitro* através de ensaios de conjugação em meio sólido, realizados em duplicado. As estirpes receptoras utilizadas nestes ensaios foram a *E. coli* BM21R (resistente ao ácido nalidíxico e à rifampicina, fermentadora da lactose, sem plasmídeos) ou a *E. coli* HB101 (resistente à estreptomicina e à azida sódica, não fermentadora da lactose, sem plasmídeos), no caso de isolados produtores de qAmpC resistentes à rifampicina. As estirpes dadoras e receptoras cultivaram-se em meio CLED (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e incubaram-se durante 18-24h a 37°C em atmosfera aeróbia. Destas culturas transferiu-se uma única colónia para 5 mL de caldo Luria-Bertani (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), seguindo-se uma incubação durante 18-24h a 37°C em atmosfera aeróbia. Em balões de vidro individuais contendo 50 mL de caldo Luria-Bertani foi adicionado 1 mL do caldo de crescimento das estirpes dadoras e receptoras, respectivamente, incubando-se durante 4h a 37°C, com agitação. De seguida retiraram-se 200 μ L do balão contendo a estirpe dadora e 400 μ L do balão contendo a estirpe receptora, os quais se sobrepuseram em placas de meio Mueller-Hinton agar (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (rácio dadora/receptora de 1:2), que se incubaram a 37°C em atmosfera aeróbia, durante 18-24 horas. O crescimento bacteriano obtido foi colhido com zaragatoa e transferido para 4 mL de soro fisiológico estéril. Posteriormente, para selecção de transconjugantes, espalharam-se 100 μ L desta suspensão em placas de meio MacConkey Agar (Liofilchem, Roseto, Itália) contendo cefoxitina (10 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e rifampicina (100 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), ou cefoxitina (10 mg/L) e azida sódica (200 mg/L) (Merck, Munique, Alemanha), dependendo da estirpe receptora usada (Verdet *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2004). De seguida incubaram-se as placas durante 18-24h a 37°C em atmosfera aeróbia. A identidade dos transconjugantes obtidos nas placas de selecção foi confirmada através da

análise de marcadores fenotípicos específicos das estirpes dadoras e receptoras, pela realização do teste PBA, pesquisa de replicões por PCR e hibridação com sondas *bla*_{qAmpC}.

6. ANÁLISE DOS PLAMÍDEOS

6.1. *Determinação do número e tamanho*

O número e tamanho dos plasmídeos estimou-se nos transconjugantes, ou na ausência destes na estirpe selvagem, pela técnica PFGE-S1 nuclease (Barton *et al.*, 1995). A técnica consiste numa análise do DNA genómico através de electroforese em campo pulsado (ver secção 4.1) após digestão com a enzima S1 nuclease (Promega, Madison, EUA) durante 15 minutos a 37°C (parando-se a reacção com 10 μ L de EDTA 0.5 M, pH 8.0). Esta enzima digere totalmente o DNA cromossómico e converte o DNA superenrolado dos plasmídeos em DNA linear, permitindo que a sua migração num gel de PFGE seja directamente proporcional ao seu tamanho e comparável com os marcadores de peso molecular usados (*Low Range PFG marker* (0.1-200 kb) e *Lambda Ladder PFG marker* (48.5-1,018.5 kb), New England Biolabs, Ipswich, EUA). Para a separação dos plasmídeos utilizaram-se as seguintes condições de electroforese: 14°C a 6 V/cm durante 19 h, com tempo de pulsos variando entre 2.2 segundos e 63.8 segundos (2.2-63.8s).

6.2. *Identificação do grupo de incompatibilidade*

Os plasmídeos presentes nos transconjugantes ou, na ausência destes, nas estirpes selvagens produtoras de qAmpC, foram classificados por um esquema de PCR descrito por Carattoli *et al.* (2005) para a amplificação específica de 18 replicões representativos dos principais grupos de incompatibilidade descritos em *Enterobacteriaceae*: IncA/C, B/O, FIA, FIB, FIC, FII, FIIs, HI1, HI2, I1, K/B, L/M, N, P, T, W, X e Y. Usaram-se os *primers* descritos por Carattoli *et al.* (2005). Adicionalmente, pesquisou-se a presença de plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade IncFIIk e IncR, utilizando-se os pares de *primers* FIIk_FW/FIIk_RV, e IncR_FW/IncR_RV, respectivamente (Villa *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2009). A extracção do DNA utilizado nestas reacções efectuou-se pela técnica descrita em 3.1. Todas as reacções foram efectuadas num volume final de 25 μ L contendo *primers* (0.8 μ M), deoxinucleótidos (0.16 mM, Finnzymes, Espoo, Finlândia), MgCl₂ (1.5 mM), Tampão da enzima (1X, Green GoTaq[®] Flexi Buffer), 0.5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase, Promega,

Madison, EUA), 2 μ L de DNA e água ultra-pura para diluir os reagentes até à concentração final pretendida. As condições de amplificação foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. A amplificação foi concluída com um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O *annealing* dos *primers* para IncFII efectuou-se a 52°C. Foram usados como controlos positivos estirpes de *E. coli* DH5a contendo replicões dos diferentes grupos de incompatibilidade clonados no vector TA (Carattoli *et al.*, 2005, Novais *et al.*, 2006). A identidade dos replicões amplificados por PCR foi verificada por sequenciação (ver secção 3.6).

6.3. Identificação e caracterização de plasmídeos contendo *bla*_{qAmpC}

A identificação de plasmídeos contendo genes *bla*_{qAmpC} realizou-se através da técnica de hibridação do DNA plasmídico em estudo com sondas *bla*_{qAmpC} obtidas por PCR. Para isso efectuou-se a separação do DNA plasmídico pela técnica de PFGE-S1 nuclease (ver secção 6.1.), seguindo-se a sua transferência para uma membrana de nylon pela técnica de *Southern Blot* (Brown, 2001).

6.3.1. Southern Blot

De uma forma resumida, esta técnica consistiu na exposição do gel de PFGE-S1 nuclease à luz UV durante 2 minutos (etapa de fixação do DNA), na colocação do gel numa solução de NaOH 0.4 N durante 90 minutos (etapa de desnaturação do DNA) e na construção de um sistema de transferência de DNA por capilaridade. Para a montagem deste sistema utilizou-se uma tina contendo um suporte sólido com as mesmas dimensões do gel, sobre o qual se colocou uma folha de papel Whatman humedecida em solução de NaOH 0.4 N com a mesma largura do gel, mas com comprimento suficiente para que os extremos ficassem submersos no líquido de transferência colocado na tina (NaOH 0.4 N). Sobre a folha de papel Whatman depositou-se o gel de agarose com os poços voltados para baixo, e sobre este, uma membrana de nylon (Hybond+, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) com as mesmas dimensões, pré-humedecida em NaOH 0.4 N e com um dos cantos cortados para se conhecer a sua orientação. Sobre a membrana colocaram-se ainda duas folhas de papel Whatman com as mesmas dimensões, papel absorvente e um peso adicional, de forma a manter o sistema e favorecer a transferência

do DNA do gel para a membrana por capilaridade. Os bordos da tina foram cobertos com papel aderente. O tempo de transferência foi de 48h, seguindo-se a lavagem da membrana em solução Tris 0.5 M (pH=7) e de seguida em SSC 2X durante 5 minutos, respectivamente. No final, o DNA transferido foi fixado na membrana por exposição da mesma à luz UV durante 3 minutos. A membrana obtida foi utilizada de imediato ou armazenada a -20°C.

6.3.2. Marcação das sondas e hibridação

A marcação das sondas e as reacções de hibridação foram efectuadas utilizando o sistema comercial AlkPhos DirectTM Labelling and Detection system (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), que se baseia numa reacção de quimioluminescência, tendo sido seguidas todas as indicações e procedimento descritos pelo fabricante. De uma forma resumida, prepararam-se sondas específicas para os genes *bla*_{qAmpC} detectados e para replicões (*rep*) específicos, utilizando-se o DNA obtido por PCR, o qual foi purificado (ver secção 3.5), desnaturado pelo calor e unido covalentemente à fosfatase alcalina (enzima termoestável). A hibridação das sondas com o DNA fixado nas membranas efectuou-se em líquido de hibridação contendo a sonda preparada, incubando-se em forno de hibridação a uma temperatura de 55°C durante 18h. A lavagem das membranas para eliminação do excesso de sonda decorreu à mesma temperatura. Para a geração do sinal de hibridação utilizou-se o substracto CDP-*Star* (CDP-*Star* Detection Reagent, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), sobre o qual actua a fosfatase alcalina, originando-se um produto emitindo luminescência. Esta foi detectada utilizando placas de autoradiografia Hyperfilm-ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), que foram expostas à membrana durante 3h (na ausência de luz) e depois reveladas em máquinas automáticas. Quando houve necessidade de hibridar uma membrana mais do que uma vez, procedeu-se à eliminação da sonda previamente fixada numa solução desnaturante de SDS a 1% (80°C, 30 minutos).

A identificação do(s) plasmídeo(s) contendo genes *bla*_{qAmpC} foi estabelecida quando ocorreu a hibridação da sonda para genes *bla*_{qAmpC} a DNA presente na membrana. A correspondência do replicão identificado com o plasmídeo codificando para a β -lactamase foi confirmada quando as sondas para os genes *bla*_{qAmpC} e *rep* hibridaram no mesmo fragmento de DNA.

IV. RESULTADOS

1. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE AmpC

Foram identificados 100 isolados bacterianos presumíveis produtores de AmpC de acordo com os critérios de selecção fenotípica previamente estabelecidos (89 FOX^R, CEF^{I/R} e AMC^{I/R}; 11 FOX^S, CEF^{I/R}, AMC^{I/R} e não produtores de ESBLs), correspondendo a 52 *K. pneumoniae*, 34 *E. coli*, 13 *K. oxytoca* e 1 *P. mirabilis*.

A expressão de AmpC foi confirmada em 59% (59/100; 44 *K. pneumoniae*, 10 *E. coli*, 5 *K. oxytoca*) dos isolados identificados como presumíveis produtores de AmpC, tendo sido apenas detectada entre os isolados resistentes à cefoxitina (66%, 59/89). Na execução do teste PBA, verificou-se frequentemente nos isolados produtores de qAmpC, a presença de colónias dispersas junto do limite da zona de inibição de cefotetan, um traço fenotípico que não pôde ser observado em alguns isolados (H89, H329 e H646) cuja zona de inibição de cefotetan era muito reduzida (≤ 6 mm).

2. OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE GENES *bla*_{qAmpC}

Foram detectados genes *bla*_{qAmpC} em 50% (50/100) dos isolados bacterianos presumíveis produtores de AmpC, que corresponderam a dois tipos distintos: *bla*_{DHA-1} (n=47) e *bla*_{CMY-2} (n=3) (Figura 9). Não foi encontrado nenhum isolado contendo genes *bla*_{qAmpC} do tipo CMY-1, MOX, FOX, ACC, ACT, MIR, LAT ou CFE.

Os genes *bla*_{qAmpC} foram identificados em isolados bacterianos obtidos maioritariamente de amostras de urina (38%, 19/50) ou do tracto respiratório (26%, 13/50), e de entre outros tipos de amostras clínicas (36%, 18/50). A distribuição dos genes *bla*_{qAmpC} identificados pelas espécies e pelas instituições incluídas no estudo encontra-se na Tabela 6. Pode verificar-se que os genes *bla*_{CMY-2} apenas se detectaram em *E. coli* durante o período 2006-2007 e nos Hospitais B e C. Por outro lado, genes *bla*_{DHA-1} detectaram-se em *Klebsiella* spp. e *E. coli*, no período 2003-2008 e em todas as instituições de saúde incluídas.

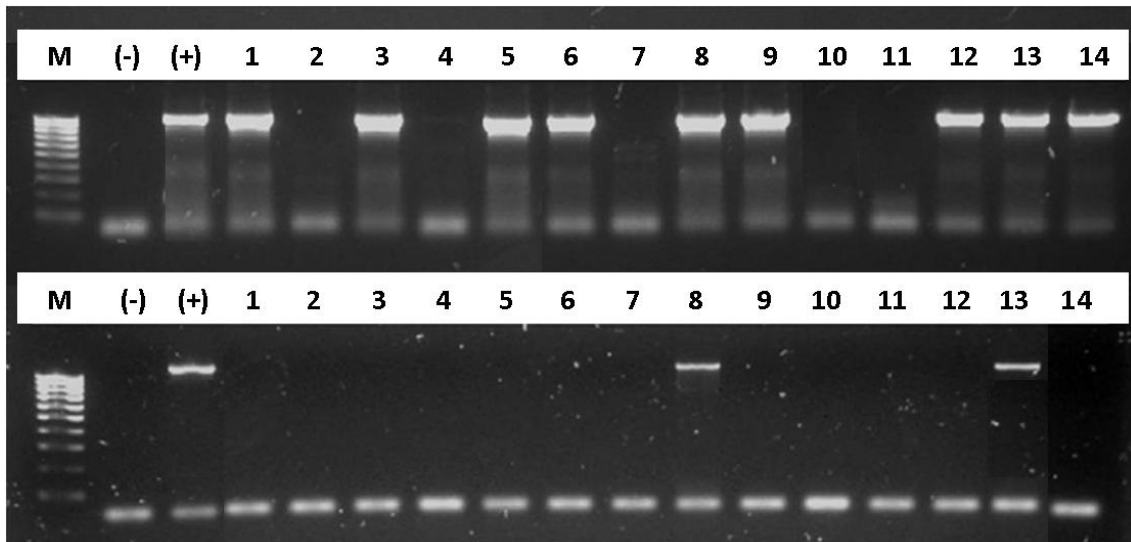


Figura 9. Amplificação de genes bla_{qAmpC} por PCR. Linha 1 – Posições: M, marcador de peso molecular (100-1000 pb, HyperLadder™ IV (Bioline, Uppsala, Suécia); (-), controle negativo; (+), controle positivo; 1-14, amplificação de genes bla_{DHA} (1008pb); Linha 2 – Posições: M, marcador de peso molecular; (-), controle negativo; (+), controle positivo; 1-14, amplificação de genes tipo bla_{CMY-2} (1143pb).

Tabela 6. Ocorrência e diversidade de genes bla_{qAmpC} .

bla_{qAmpC}	Espécie (n)	Ano	Instituição de Saúde (n)
bla_{CMY-2}	<i>E. coli</i> (3)	2006	HB (1), HC (1)
		2007	HB (1)
bla_{DHA-1}	<i>E. coli</i> (2)	2007	HB (1)
		2008	HA (1)
bla_{DHA-1}	<i>K. pneumoniae</i> (41)	2003	HA (3)
		2004	HA (12), LE (1)
		2006	HA (4), HB (1)
		2007	HA (3), HB (4), HC (3)
		2008	HA (6), HB (4)
bla_{DHA-1}	<i>K. oxytoca</i> (4)	2003	HA (2)
		2004	HA (1)
		2008	HA (1)

HA, Hospital A; HB, Hospital B; HC, Hospital C; LE, Laboratórios da comunidade.

3. AVALIAÇÃO DO TESTE PBA NA DETECÇÃO DE qAmpC

Comparando os resultados obtidos no teste PBA e nos testes genotípicos (PCR e sequenciação) para identificação de *bla*_{qAmpC}, verificou-se que o teste PBA detectou correctamente 48 dos 50 isolados contendo genes *bla*_{qAmpC} (Tabela 7). No entanto, verificaram-se 11 resultados falsos positivos no teste PBA (7 *E. coli*, 3 *K. pneumoniae* e 1 *K. oxytoca*), e 2 resultados falsos negativos (*E. coli*). Globalmente, o teste apresentou uma sensibilidade de 96% e especificidade de 71.8%, sendo o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) de 81.4% e 93.3%, respectivamente.

Tabela 7. Avaliação do teste PBA na detecção de qAmpC em comparação com os testes genotípicos.

Espécie (n)	PBA (+) (n=59)		PBA (-) (n=30)	
	<i>bla</i> _{qAmpC} (+) ^a	<i>bla</i> _{qAmpC} (-) ^b	<i>bla</i> _{qAmpC} (+) ^a	<i>bla</i> _{qAmpC} (-) ^b
<i>K. pneumoniae</i> (50)	41	3	0	6
<i>K. oxytoca</i> (9)	4	1	0	4
<i>E. coli</i> (29)	3	7	2	17
<i>P. mirabilis</i> (1)	0	0	0	1
Total (89)	48	11	2	28

^aNúmero de isolados contendo genes *bla*_{qAmpC}; ^bNúmero de isolados sem genes *bla*_{qAmpC}.

4. CO-PRODUÇÃO DE ESBLs EM ISOLADOS CONTENDO *bla*_{qAmpC}

A expressão de ESBLs foi detectada em 87% (41/47) dos isolados produtores de DHA-1. Em *K. pneumoniae* identificaram-se ESBLs tipo SHV-5 (12%, 5/41), SHV-12 (20%, 8/41), SHV-90 (15%, 6/41) ou tipo SHV (23%, 12/41). Em *K. oxytoca* identificaram-se ESBLs do tipo SHV-12 (75%, 3/4) e tipo SHV (1/4), enquanto em *E. coli* se identificou CTX-M-32 (1/2) e tipo SHV (2/2) (Tabela 8). Os isolados produtores de CMY-2 não expressaram ESBLs (Tabela 9).

5. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS ENTRE OS ISOLADOS CONTENDO *bla*_{qAmpC}

Além da resistência natural à cefoxitina e à combinação amoxicilina-ácido clavulânico característica dos isolados produtores de qAmpC, verificaram-se elevadas taxas de resistência a outros antibióticos β -lactâmicos como a ceftazidima (94%), cefotaxima (88%) e aztreonamo (84%), independentemente do tipo de qAmpC presente e da espécie (Figura 10). As taxas de resistência à cefepima, ao imipenemo e ao

meropenemo foram de 8%, 4% e 0%, respectivamente. A resistência à cefepima e ao imipenemo foi mais elevada em *K. oxytoca* produtoras de DHA-1 (25%, 1/4). Não se observou resistência à cefepima ou ao imipenemo nos isolados produtores de CMY-2.

Quanto aos antibióticos não- β -lactâmicos, verificaram-se também elevadas taxas de resistência em todas as classes estudadas, maioritariamente superiores a 70% (Figura 10), pelo que a resistência múltipla (resistência a 3 ou mais classes de antibióticos) observada foi de 100% entre os isolados contendo *bla*_{qAmpC}. Estes foram frequentemente resistentes à canamicina (98%), tobramicina (96%), sulfonamidas (96%), ciprofloxacina (82%) e trimetoprim (80%). A quase totalidade dos isolados (94%) apresentou simultaneamente co-resistência à canamicina, tobramicina e sulfonamidas. Quando extendida ao ácido nalidíxico, à estreptomicina e à ciprofloxacina a co-resistência foi de 86%, 74% e 66% respectivamente. A tigeciclina e a amicacina foram os antibióticos não- β -lactâmicos para os quais se observaram as menores taxas de resistência (8% e 26%, respectivamente) entre os isolados produtores de qAmpC.

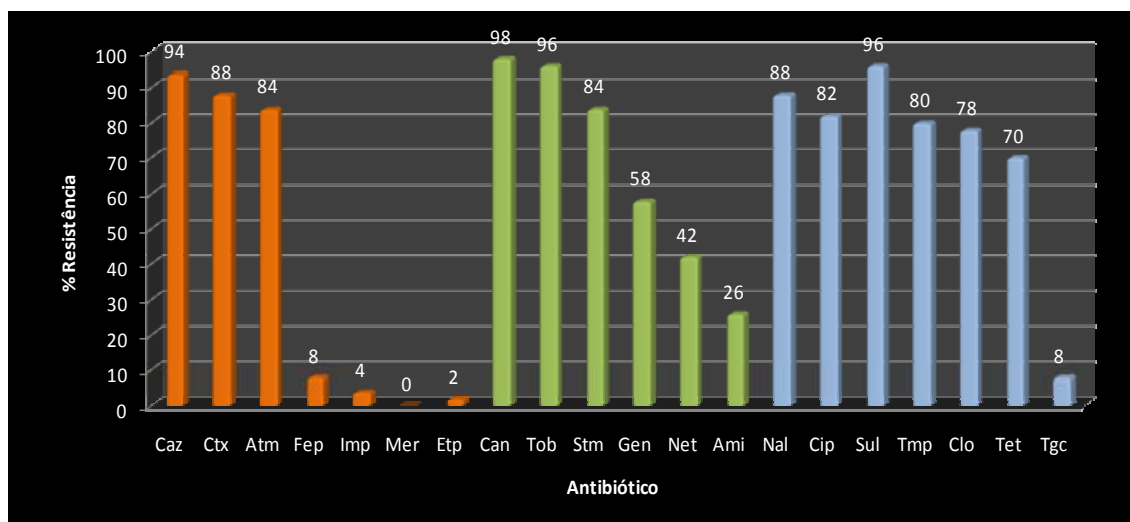


Figura 10. Resistência aos antibióticos entre os isolados produtores de qAmpC. β -lactâmicos – barras a laranja; Aminoglicosídeos – barras a verde; Outras classes de antibióticos – barras a azul).

6. ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *KLEBSIELLA* SPP. E *E. COLI* PRODUTORES DE qAmpC

Os genes *bla*_{DHA-1} foram detectados em 12 clones diferentes de *K. pneumoniae* (clones KpA-KpL, 6 subtipos) (Figura 11A), em 2 clones de *K. oxytoca* (KoA-KoB, 1 subtipo) (Figura 11B) e em 2 clones de *E. coli* (Tabela 8). Em 3 isolados não foi possível fazer a análise clonal devido à degradação do DNA.

Em *K. pneumoniae* os clones mais representativos foram o KpB (n=14) e o KpF (n=13), recolhidos no Hospital A (entre Outubro de 2003 e Dezembro de 2004) e nos hospitais A, B e C (entre Abril de 2006 e Junho de 2008), respectivamente (Figura 11A, Tabela 8). A tipagem por MLST de isolados de *K. pneumoniae* representativos de clones específicos revelou a presença de diferentes clones: ST11, ST443 e de dois clones cuja designação terá ainda de ser solicitada, dado apresentarem novas sequências para os alelos *phoE* e *tonB*, ou combinações de alelos que incluem *rpoB10* ainda não encontradas na base de dados, respectivamente. ST11 foi observado em *K. pneumoniae* apresentando distintos padrões de PFGE (KpF e KpG), enquanto ST443 foi observado num único isolado (KpA) com origem extra-hospitalar. Uma nova combinação de alelos foi observada no clone B enquanto novos alelos que compõem uma nova combinação do esquema de MLST foram detectados no clone E.

K. oxytoca produtoras de DHA-1 ocorreram apenas no Hospital A, sendo o clone KoA o mais prevalente (n=3; Janeiro de 2003-Agosto de 2004) (Figura 11B, Tabela 8). *E. coli* produtoras de DHA-1 foram detectadas no Hospital A (n=1, 2007) e B (n=1, 2008), tendo-se identificado os clones B1-ST1196 (n=1) e B2-*fumC24* (n=1) (Tabela 8).

Os genes *bla*_{CMY-2} foram detectados em *E. coli* (n=3) com distintos pulsotipos (padrões de PFGE) (Figura 11C), todos pertencendo ao grupo filogenético B1 e a diferentes linhagens clonais, uma das quais identificadas como ST101 (Tabela 9).

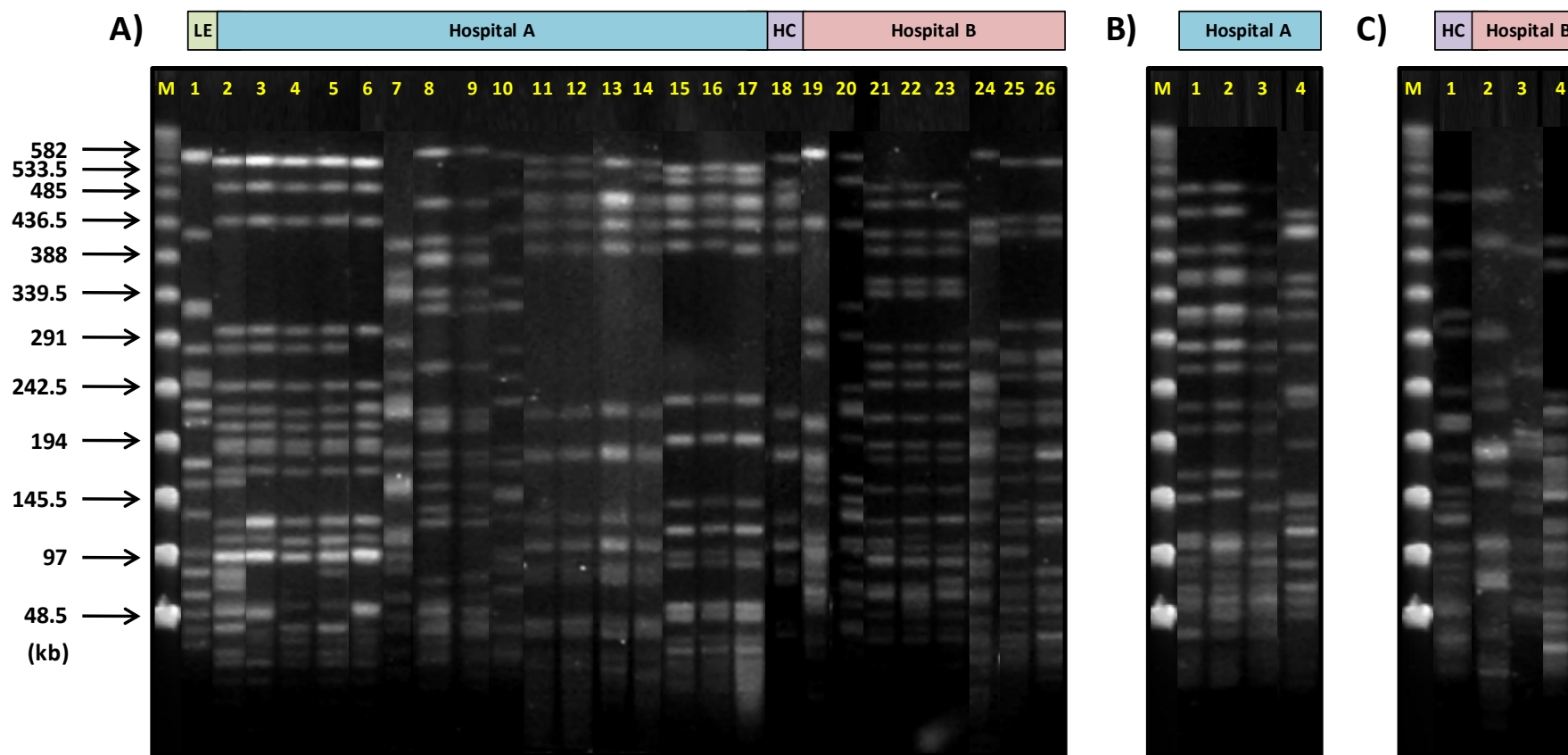


Figura 11. Padrões de restrição gerados por PFGE após digestão do DNA genômico com *Xba*I. A) *K. pneumoniae* produtoras de DHA-1. Posições: M, marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG marker, New England Biolabs); 1, clone KpA; 2-6, clone KpB; 7, clone KpG; 8-9, clone KpJ; 10, clone KpK; 11-18, clone KpF; 19, clone KpC; 20, clone KpD; 21-23, clone KpE; 24, clone KpH; 25-26, clone KpI. B) *K. oxytoca* produtoras de DHA-1. Posições: M, marcador de peso molecular; 1-3, clone KoA; 4, clone KoB. C) *E. coli* produtoras de qAmpC. Posições: M, marcador de peso molecular; 1, clone EcA (CMY-2); 2, clone EcB (CMY-2); 3, clone EcC (CMY-2); 4, clone EcD (DHA-1).

7. ANÁLISE DA TRANSFERIBILIDADE DE *bla*_{qAmpC}

Os ensaios de transferência por conjugação de *bla*_{DHA-1} foram negativos em todos os isolados contendo estes genes, apesar das diferentes tentativas e estirpes receptoras usadas. Genes *bla*_{CMY-2} foram transferidos por conjugação em 1 de 3 isolados.

8. ANÁLISE PLASMÍDICA

A análise do conteúdo plasmídico dos isolados produtores de qAmpC revelou a presença de um número variável de plasmídeos (entre 1 e 5), sendo que dezasseis isolados (32%, 16/50) continham apenas um plasmídeo e oito (16%, 8/50) albergavam dois plasmídeos. Dois isolados de *E. coli* (4%, 2/50) apresentaram 5 plasmídeos. Em 44% (22/50) dos isolados não foi possível determinar o conteúdo plasmídico pela técnica de PFGE-S1 nuclease.

Nos isolados produtores de DHA-1, a determinação dos grupos de incompatibilidade revelou a presença de 1 a 4 replicões por bactéria, correspondentes a nove replicões distintos (FII, FIB, FIIs, FIIk, HI2, I1, N, P e R), sendo que 72% (34/47) dos isolados continham 3 ou 4 replicões. Verificou-se uma predominância de IncFIIk (70%, 33/47), IncFIIs (55%, 26/47), IncHI2 (53%, 25/47), e IncR (49%, 23/47), principalmente entre os isolados de *K. pneumoniae* (98%, 40/41) (Tabela 8). Replicões do tipo IncFIIk e IncFIIs foram identificados apenas em *K. pneumoniae*, enquanto IncHI2 e IncR se detectaram entre as três espécies produtoras de DHA-1 analisadas. Nos isolados respeitantes ao período 2003-2004 observou-se uma maior frequência de IncHI2 (89%, 17/19) e IncFIIk (74%, 14/19), enquanto nos isolados mais recentes (2006-2008) se observou uma maior frequência de IncR (79%, 22/28) e IncFIIk (68%, 19/28).

Dois perfis de replicões ocorreram com maior frequência, nomeadamente IncHI2-IncFIIs-IncFIIk (n=13, em *K. pneumoniae*, 2003-2007) e IncFIIs-IncFIIk-IncR (n=11, em *K. pneumoniae*, 2006-2008). O primeiro perfil encontra-se predominantemente associado aos clones KpB (n=9), KpD (n=1) e KpE (n=3), circulando nos hospitais A (n=9) e B (n=4), enquanto o segundo está associado aos clones KpF (n=10) e KpG (n=1), detectados nos hospitais A (n=8), B (n=1) e C (n=2). A presença isolada de replicões IncHI2 (n=4) e IncR (n=3) verificou-se em bactérias

maioritariamente provenientes do Hospital A (n=5). Num isolado de *K. pneumoniae* não foi identificado nenhum dos replicões pesquisados. Dados mais completos sobre a análise dos replicões podem ser visualizados na Tabela 8.

A hibridação dos géis de PFGE-S1 nuclease com a sonda *bla*_{DHA-1} gerou sinal predominantemente em plasmídeos com um tamanho aproximado de 50 kb, embora num número reduzido de isolados esse sinal também tenha sido visualizado em plasmídeos com cerca de 40 kb (n=1), 80 kb (n=1), 180 kb (n=1), 300 kb (n=1) e 350 kb (n=1) (Tabela 8). Os estudos de hibridação que se seguiram demonstraram que em três isolados de *K. pneumoniae* o gene *bla*_{DHA-1} se encontra localizado em plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncR de 50 kb (n=2) ou 180 kb (n=1), respectivamente. Os primeiros foram provenientes do Hospital A e pertencem aos clones KpF (ST11) e KpJ, enquanto o outro isolado é proveniente da comunidade (LE), pertencendo ao clone ST443. Verificou-se ainda a localização de *bla*_{DHA-1} em *E. coli* (clone EcD, Hospital B) e *K. oxytoca* (clone KoA, Hospital A) em plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncHI2 de 350 e 300 kb, respectivamente. As hibridações com sonda IncFIIIs não ocorreram em plasmídeos contendo *bla*_{DHA-1} (Tabela 8).

Entre os 3 isolados de *E. coli* produtores de CMY-2 detectaram-se 2 ou 4 replicões por bactéria, correspondentes a 6 replicões distintos: IncA/C₂, IncFIB, IncFII, IncI1, IncK e IncY. Cada um dos isolados bacterianos apresentou associações diferentes de replicões, tendo sido frequente a identificação de IncFIB ou de IncK (n=2/3, respectivamente) (Tabela 9). A hibridação do DNA genómico digerido com S1 nuclease (PFGE-S1 nuclease) com sondas específicas permitiu estabelecer que o gene *bla*_{CMY-2} se encontra localizado em plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncK de 80 kb (n=2) ou IncA/C₂ de 150 kb (n=1). O transconjugante obtido do isolado do clone EcA, continha *bla*_{CMY-2} em plasmídeos do mesmo tamanho e grupo de incompatibilidade que a estirpe dadora (IncK de 80 kb).

9. CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE GENÉTICO DE *bla*_{qAmpC}

9.1. Ambiente genético de *bla*_{DHA-1}

Foi detectada a presença de genes de resistência a antimicrobianos, sequências de inserção e integrões habitualmente descritos no ambiente genético de *bla*_{DHA-1}, embora tenha sido observada variabilidade na sua ocorrência entre os 47 isolados produtores de DHA-1: *qnrB4* (n=47), *sul1* (n=47), *aac(6')-Ib-cr* (n=45), *bla*_{OXA-1} (n=28), *catB3* (n=28), *arr-3* (n=28), IS26 (n=47), ISCR1 (n=46) e *intI1* (n=46). Na Tabela 8 pode verificar-se a existência de dois perfis genéticos predominantes, um incluindo 6 genes (*intI1*, *aac(6')-Ib-cr*, *sul1*, ISCR1, *qnrB4*, IS26), detectado em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* provenientes do Hospital A (KpB, n=14; KoA, n=2), referentes ao período 2003-2004. O outro perfil inclui todos os genes pesquisados (*intI1*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla*_{OXA-1}, *catB3*, *arr-3*, *sul1*, ISCR1, *qnrB4*, IS26), ocorrendo em *K. pneumoniae*, provenientes do Hospital A, B, C e de laboratórios da comunidade (LE) (KpA, n=1; KpC, n=1; KpD, n=1; KpE, n=3; KpF, n=12; KpG, n=1; KpH, n=1; KpI, n=2; KpJ, n=2), e ainda em *K. oxytoca* do Hospital A (KoB, n=1) e *E. coli* do Hospital B (EcD, n=1), referentes ao período 2004-2008. No primeiro perfil observa-se uma maior frequência de replicões IncHI2 (n=15) e IncFIIk (n=13) (presença de ambos observada em 12 isolados), enquanto para o segundo perfil é maior a frequência de IncR (n=21) e IncFIIk (n=17) (presença de ambos observada em 12 isolados) (Tabela 8).

A amplificação da região variável de integrões de classe 1 (5'CS-3'CS) resultou negativa em 53% (25/47) dos isolados produtores de DHA-1, apesar do gene *intI1* ter sido detectado em 24 desses 25 isolados, incluindo-se neste grupo todos os isolados do clone KpB. Aquela amplificação resultou positiva em 47% (22/47) dos isolados, todos contendo o gene *intI1* e a maioria pertencendo ao clone KpF (n=10). Apenas um isolado de *K. pneumoniae* (KpL) foi negativo simultaneamente para *intI1* e 5'CS-3'CS. A análise de produtos de amplificação representantes dos diferentes tamanhos obtidos (0.3-1.3 kb) evidenciou a presença dos genes *aac(6')-IIC* (KoA, n=1), *aadA2* (KpF, n=3) e *dfrA25* (KpI, n=1).

Os estudos de PCR *mapping* foram efectuados em representantes de isolados bacterianos apresentando os dois perfis genéticos acima descritos, sendo no entanto

mais completos para um isolado, pertencente ao clone KoB, apresentando o perfil genético que inclui maior número de genes detectados, o que permitiu obter alguns dados sobre o ambiente genético em torno de *bla*_{DHA-1}. Os fragmentos de DNA amplificados e sequenciados durante as estratégias de PCR *mapping* encontram-se representados na Figura 12A, em relação ao integrão In37 (plasmídeo pHSH2, n° de acesso *GenBank* AY259086) e ao integrão InNMDHA (plasmídeo pNMDHA, n° de acesso *GenBank* GU943791), com o qual se pensa existir 100% de homologia. De referir que a caracterização molecular por PCR *mapping* da regiões compreendidas entre *ISCR1* (região que inclui uma recombinase denominada *orf513*) e *qnrB4* e entre *pspA* e *pspD* não ficou concluída, não estando por isso confirmada a organização genética nesta zona.

9.2. Ambiente genético de *bla*_{CMY-2}

Os genes *blc* e *finQ* foram detectados nos três isolados de *E. coli* produtores de CMY-2, enquanto *ISEcp1* apenas foi observado em 2 isolados (Tabela 9). O estudo da organização genética em torno de *bla*_{CMY-2} pela estratégia de PCR *mapping* permitiu confirmar a presença de *ISEcp1* a montante de *bla*_{CMY-2} apenas no isolado pertencente ao clone EcA (Hospital C) (Figura 12B). Mesmo utilizando um *primer* que se liga ao final de *ISEcp1* (*primer* 12, Tabela 5) não foi possível demonstrar a associação destes dois genes nas restantes estirpes. A associação de *blc* a jusante de *bla*_{CMY-2} foi estabelecida em dois isolados (EcA, Hospital C; EcB, Hospital B) e carece de confirmação no isolado pertencente ao clone EcC, uma vez que a sequência obtida foi demasiado curta. A associação do gene *blc* ao gene *finQ* não foi confirmada em nenhum dos isolados produtores de CMY-2.

Tabela 8. Características epidemiológicas dos isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtores de DHA-1 obtidos de instituições clínicas Portuguesas (2002-2008).

Espécie	PFGE	Nr. ^a	Phg ^b	MLST ^c	Conteúdo plasmídico ^d	Replicações por PCR ^e	Co-resistência a antibióticos não- β -lactâmicos ^f	ESBLs ^g	Período	Instituição	Genes detectados
<i>E. coli</i>	EcD	1	B1	ST1196	350 ^h ,170, 130,90,50	FII, FIB, HI2, R ⁱ	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	tipo SHV	2007	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>E. coli</i>	EcND	1	B2	<i>fumC24</i>	-	FII, FIB, I1, R	Cm,Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su,Tp,Te	SHV, CTX-M-32	2008	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpA	1		ST443	180	R	Cm,Tb,Cp,Na,Su	tipo SHV	2004	LE	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB	4		ND ^j	ND	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,(Am,Cp,Na),Su,Tp,Te,(Cl)	SHV-90	2003/04	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB	1		ND	95	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Su,Tp,Te,Cl	SHV-90	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB	1		ND	50	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Am,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-12	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB	1		ND	350,95,50	HI2, FIIk ⁱ	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Am,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-12	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB	1		ND	ND	HI2	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-12	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB1	2		ND	-	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,(Am,Cp),Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-5	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB2	1		ND	40	HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Am,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-5	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB3	1		ND	-	FIIs, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Su,Tp,Te,Cl	SHV-5	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB4	1		ND	ND	HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Am,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-5	2003	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpB5	1		ND	350,210,95	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-90	2004	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpC	1		ND	-	-	Cm,Tb,Gm,Nm,Am,Cp,Su,Te,Cl	tipo SHV	2006	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpD	1		ND	-	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Am,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-12	2007	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpE	1		ND	190	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su	SHV-12	2007	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpE	1		ND	40	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Gm,Cp,Na,Su	tipo SHV	2007	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpE	1		ND	-	FIIs, HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Am,Cp,Na,Su	SHV-12	2007	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	2		ST11	190,50	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	(-)	2006/08	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	3		ST11	190,50	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl,(Tg)	tipo SHV	2006/08	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	1		ST11	190,50	FIIs, N, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	tipo SHV	2007	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	3		ST11	50	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,(Am),Cp,Na,Su,Tp,Cl	(-)	2007/08	HA/HB/HC	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	1		ST11	50	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	tipo SHV	2008	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	1		ST11	40	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Cl	SHV-12	2007	HC	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	1		ST11	50	R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Te,Cl	tipo SHV	2007	HC	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpF	1		ST11	-	R	Cm,Tb,Cp,Na,Su,Te	tipo SHV	2007	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpG	1		ST11	-	FIIs, FIIk, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	tipo SHV	2006	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpH	1		ND	50	HI2, N, R	Cm,Tb,Gm,Cp,Na,Su,Te,Cl	(-)	2008	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpI	1		ND	-	HI2, N, R	Cm,Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	(-)	2008	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>

Espécie	PFGE	Nr. ^a	Phg ^b	MLST ^c	Conteúdo plasmídico ^d	Replicões por PCR ^e	Co-resistência a antibióticos não- β -lactâmicos ^f	ESBLs ^g	Período	Instituição	Genes detectados
<i>K. pneumoniae</i>	KpI1	1		ND	-	HI2, R	Cm,Tb,Gm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	SHV-12	2008	HB	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpJ	2		ND	50	FIB, FIIk, <u>R</u>	Cm,Tb,(Sm),Nm,(Am),Cp,Na,Su,Tp,(Cl,Tg)	ND ^h	2008	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpK	1		ND	-	HI2, N, FIIk	Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su,Tp	tipo SHV	2008	HA	<i>Int11, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KpL	1		ND	-	HI2, FIIk	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,Su,Tp,Te,Cl,Tg	tipo SHV	2004	HA	<i>aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. oxytoca</i>	KoA	2		ND	-	HI2	Cm,Tb,Sm,Gm,Nm,(Am),Cp,Na,Su,Tp,(Te),Cl,(Tg)	SHV-12	2003	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. oxytoca</i>	KoA1	1		ND	300^h	<u>HI2</u>	Cm,Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su,Tp,Cl	SHV-12	2004	HA	<i>Int11, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>
<i>K. oxytoca</i>	KoB	1		ND	80	FII, P, R	Cm,Tb,Sm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	tipo SHV	2008	HA	<i>Int11, aac(6)-Ib-cr; bla_{OXA-1}, catB3, arr-3, sul1, ISCR1, qnrB4, IS26</i>

^aNúmero de isolados; ^bGrupos filogenéticos de *E. coli*; ^cEm alguns casos apenas se sequenciou o alelo *fumC* de modo a constatar a presença de STs mais disseminados. Os dados serão completados futuramente; ^dO tamanho do plasmídeo (kb) contendo o gene *bla_{DHA-1}*, determinado por hibridação do DNA genômico digerido com S1 nuclease (PFGE-S1 nuclease) com uma sonda *bla_{DHA-1}* encontra-se assinalado a negrito; ^eO grupo de incompatibilidade dos plasmídeos contendo genes *bla_{DHA-1}* foi determinada por PCR, hibridação, e em alguns casos por sequenciação do replicão. Os replicões hibridando na mesma banda plasmídica que a sonda *bla_{DHA-1}* encontram-se sublinhados. Os replicões sequenciados mostraram elevadas homologies com sequências depositadas no *GenBank*: IncHI2 (99% de identidade com pEC-IMPQ; n° de acesso *GenBank* EU855788), IncR (99% de identidade com pK245; n° de acesso *GenBank* DQ449578); ^fTodos os isolados com susceptibilidade intermédia foram considerados resistentes. A resistência variável está indicada entre parênteses. Cm, canamicina; Tb, Tobramicina; Sm, estreptomomicina; Gm, gentamicina; Nm, netilmicina; Am, amicacina; Cp, ciprofloxacina; Na, ácido nalidixico; Su, sulfonamidas; Tp, trimetoprim; Te, tetraciclina; Cl, cloranfenicol; Tg, tigeciclina; ^gtipo SHV – determinou-se a presença de genes *bla_{SHV}*, mas não se sequenciou o produto de PCR; ^hHibridação ténue; ⁱIsolados contendo plasmídeos não tipáveis; ND, Não determinado.

Tabela 9. Características epidemiológicas dos isolados de *E. coli* produtores de CMY-2 obtidos de hospitais Portugueses (2002-2008).

PFGE	Nr. ^a	Phg ^b	MLST ^c	Conteúdo plasmídico ^d	Replicões por PCR ^e	Co-resistência a antibióticos não- β -lactâmicos ^f	ESBLs	Ano	Hospital	Genes detectados	PCR mapping ^g		
											P10+P13	P11+P12	P14+P15
EcA	1	B1	ND	80,40	Y, <u>K^h</u>	Cm,Na	(-)	2006	HC	<i>ISEcp1, blc, finQ</i>	+	+	-
EcB	1	B1	<i>fumC65</i>	150,140,100,95,50	FIB, FII, II, <u>A/C₂</u>	Cm,Tb,Sm,Gm,Cp,Na,Su,Tp,Te,Cl	(-)	2006	HB	<i>ISEcp1, blc, finQ</i>	+	-	-
EcC	1	B1	ST101	100,80	FIB, <u>K</u>	Cm,Sm,Am,Cp	(-)	2007	HB	<i>blc, finQ</i>	+	-	-

^aNúmero de isolados; ^bGrupo filogenético; ^cEm alguns casos apenas se sequenciou o alelo *fumC* de modo a constatar a presença de STs mais disseminados. Os dados serão completados futuramente; ^dO tamanho do plasmídeo (kb) contendo o gene *bla_{CMY-2}*, determinado por hibridação do DNA genômico digerido com S1 nuclease (PFGE-S1 nuclease) com uma sonda *bla_{CMY-2}* encontra-se assinalado a negrito; ^eO grupo de incompatibilidade dos plasmídeos contendo genes *bla_{CMY-2}* foi determinada por PCR, hibridação, e por sequenciação do replicão. Os replicões hibridando na mesma banda plasmídica que a sonda *bla_{CMY-2}* encontram-se sublinhados. Os replicões sequenciados mostraram elevada homologia com sequências depositadas no *GenBank*: IncK [99% (EcC) e 100% (EcA) de identidade com pCT-C159/11; n° de acesso *GenBank* FN868832], IncA/C₂ (99% de identidade com p2039; n° de acesso *GenBank* AM087198); ^fTodos os isolados com susceptibilidade intermédia foram considerados resistentes. Cm, canamicina; Tb, Tobramicina; Sm, estreptomomicina; Gm, gentamicina; Am, amicacina; Cp, ciprofloxacina; Na, ácido nalidixico; Su, sulfonamidas; Tp, trimetoprim; Te, tetraciclina; Cl, cloranfenicol; ^gP10 a P15 – número dos *primers* constantes na Tabela 5, usados na amplificação das regiões que se visualizam na Figura 12B; ^hFoi observada a transferência de *bla_{CMY-2}*; ⁱIsolados contendo plasmídeos não tipáveis; ND, Não determinado.

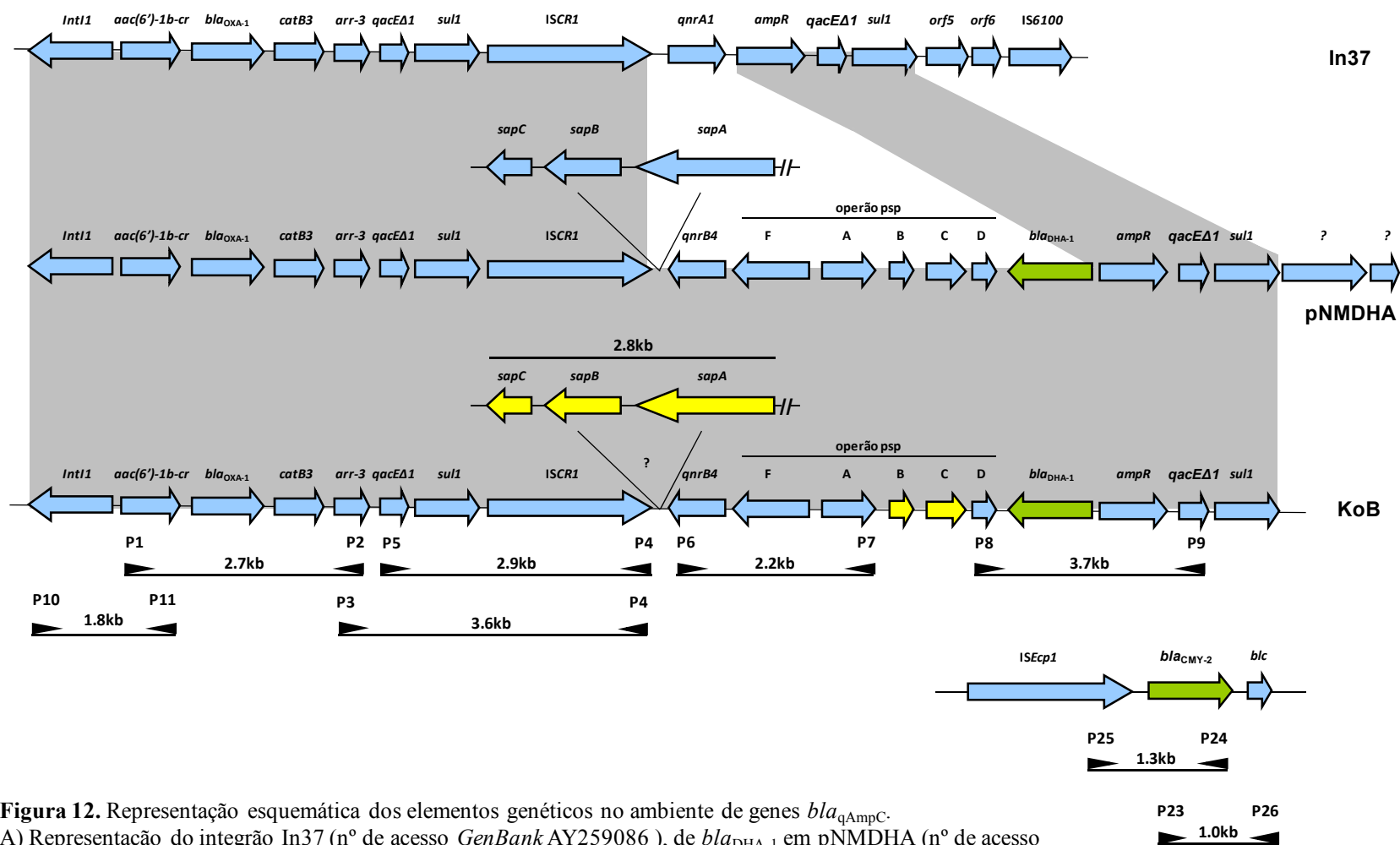


Figura 12. Representação esquemática dos elementos genéticos no ambiente de genes bla_{qAmpC} . A) Representação do integrão In37 (nº de acesso *GenBank* AY259086), de bla_{DHA-1} em pNMDHA (nº de acesso *GenBank* GU943791) e das regiões genéticas caracterizadas por PCR *mapping* e sequenciação num isolado de *K. oxytoca* (KoB) contendo bla_{DHA-1} incluído no presente estudo (ver texto). A cinza representam-se as regiões com as quais se pensa existir 100% de identidade e a amarelo as regiões que não estão confirmadas; B) Representação esquemática do ambiente genético em torno de bla_{CMY-2} num isolado de *E. coli* incluído no presente estudo (EcA). As setas e números indicam os *primers* usados na amplificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR constantes na Tabela 5. Os tamanhos obtidos nestas estratégias estão referidos na figura.

V. DISCUSSÃO

O controlo da emergência e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos é hoje uma prioridade mundial, dada a escassez actual de novas moléculas activas perante estirpes com múltiplos mecanismos de resistência (Rossolini e Mantengoli, 2008). De especial preocupação, é o acréscimo de bactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração que tem sido verificado em diferentes países da União Europeia (Gagliotti *et al.*, 2011). A multiplicidade de factores envolvidos na emergência da resistência e a sua dinâmica temporal, impõe a realização periódica de estudos moleculares para uma melhor compreensão da sua epidemiologia e como ajuda à tomada de medidas preventivas.

A observação de *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de espectro alargado, verificada desde o final da década de 80, foi inicialmente associada à hiperprodução de β -lactamases cromossómicas do tipo AmpC e à produção de ESBLs. Nos últimos anos, para além da crescente importância das ESBLs, a aquisição de carbapenemases e qAmpC têm sido associadas a crescentes insucessos terapêuticos por estes agentes (EFSA, 2011).

No presente trabalho procedeu-se ao estudo da epidemiologia de β -lactamases adquiridas do tipo AmpC (qAmpC) em *Enterobacteriaceae* desprovidas de AmpC indutível, nomeadamente *Klebsiella* spp., *E. coli* e *P. mirabilis*. A sua expressão contribui para a resistência a antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente às penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas, associações de β -lactâmicos a inibidores de β -lactamases e aztreonamo, reduzindo deste modo as opções terapêuticas para tratamento das infecções por estas bactérias.

1. OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE GENES *bla*_{qAmpC}

A análise dos resultados parece indicar que actualmente em Portugal a diversidade de qAmpCs é baixa, existindo dois tipos de qAmpC a disseminar-se entre isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* desprovidos de AmpC indutível, nomeadamente DHA-1 e CMY-2, com uma maior predominância de DHA-1 (94%,

47/50). Estas foram detectadas quase exclusivamente em isolados clínicos hospitalares de diferentes regiões geográficas e durante praticamente todo o período de estudo. Entre os isolados da comunidade apenas um demonstrou ser produtor de qAmpCs.

A urina (38%, 19/50) e as secreções respiratórias (26%, 13/50) foram os produtos biológicos onde mais frequentemente se identificaram *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC. Mata *et al.* (2010) numa colecção que incluía 64% de isolados da comunidade, e Singtohin *et al.* (2010) em isolados hospitalares (as espécies estudadas indicam-se na Tabela 10), observaram também maior número de isolados produtores de qAmpC em amostras de urina, 67% e 37% respectivamente. É reconhecido o importante papel que a colonização vaginal e intestinal por bactérias com capacidades de adesão desempenha na ocorrência da maioria das infecções do tracto urinário (Schaeffer *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2007). Os isolados produtores de qAmpC foram detectados num número significativo de serviços hospitalares, tanto no Hospital A como no Hospital B, sendo mais frequentes nos serviços de Medicina (26%, 13/50).

Relativamente à qAmpC do tipo DHA-1, esta foi encontrada numa maior diversidade de espécies, nomeadamente *K. pneumoniae* (n=41), *K. oxytoca* (n=4) e *E. coli* (n=2), demonstrando-se que além de ser a qAmpC mais frequente comparativamente com CMY-2, é especialmente predominante em *K. pneumoniae* (87%) e a única detectada em *K. oxytoca*, à semelhança de outros estudos (Mata *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2006). Recentemente em Portugal, Manageiro *et al.* (2010) detectaram uma maior diversidade de qAmpCs (DHA-1, CMY-2, CMY-46, tipo ACT, tipo FOX e tipo MIR), observando também uma maior ocorrência de DHA-1, no entanto em percentagem relativamente inferior (63%, 52/83) à do presente estudo. Uma maior ocorrência de DHA-1 em *K. pneumoniae* também tem sido verificada em estudos Europeus (Diestra *et al.*, 2010; Empel *et al.*, 2010) e no Sudeste Asiático (Yamasaki *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2010). Actualmente, DHA-1 é a segunda qAmpC mais prevalente a nível mundial a seguir a CMY-2, sendo encontrada em diversas espécies e nichos ecológicos (Jacoby, 2009; Ma *et al.*, 2009).

Os isolados produtores de DHA-1 provinham maioritariamente da zona Norte do país (72%), nomeadamente do Hospital A (n=33) e de um Laboratório da comunidade (LE, n=1), enquanto os restantes 28% foram obtidos de hospitais da zona Centro, nomeadamente do Hospital B (n=10) e do Hospital C (n=3), o que revela uma mais ampla distribuição geográfica destes isolados, comparativamente aos isolados produtores de CMY-2. *K. pneumoniae* produtoras de DHA-1 ocorreram durante todo o período de estudo, o que poderá estar relacionado com a disseminação mais eficaz de alguns clones particulares, nomeadamente KpB que terá sido a causa de um surto no Hospital A (2003-2004), e ST11, um clone epidémico detectado nos hospitais A, B e C (2006-2008). Uma análise mais pormenorizada sobre a epidemiologia e o envolvimento de clones e plasmídeos será efectuada mais adiante.

Quanto à qAmpC do tipo CMY-2, verificou-se que na amostra estudada se apresentou restrita à espécie *E. coli*. Diversos autores têm também encontrado uma maior predominância de CMY-2 nesta espécie (Corvec *et al.*, 2010; Oteo *et al.*, 2010). Em Portugal, Dias (2009) havia já descrito a presença de CMY-2 em *E. coli* (um isolado de origem clínica) e recentemente esta enzima foi também descrita em isolados de *Salmonella* Typhimurium, *C. freundii* e *P. mirabilis* (Antunes *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2008). No entanto, num estudo incluindo 30 isolados clínicos Portugueses de *E. coli*, Ferreira *et al.* (2009) não detectaram a presença de *bla*_{CMY-2}. O presente trabalho constitui por isso a segunda descrição de isolados clínicos de *E. coli* produtores de CMY-2 em Portugal. Apesar da baixa ocorrência encontrada entre os isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* estudados, CMY-2 apresenta actualmente a maior dispersão global, tanto em isolados clínicos (Iabadene *et al.*, 2009; Mirelis *et al.*, 2006; Mulvey *et al.*, 2005; Naseer *et al.*, 2010), como noutros nichos ecológicos, nomeadamente em animais (frangos, suínos, perus e cães) (Ahmed *et al.*, 2009; Carattoli *et al.*, 2005a; Doi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010) e águas para consumo humano (Mataseje *et al.*, 2009), mostrando uma maior associação a *E. coli* e *Salmonella* spp. (Deshpande *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Philippon *et al.*, 2002).

Os isolados produtores de CMY-2 foram identificados apenas em hospitais localizados na zona Centro do país, nomeadamente o Hospital B (n=2) e o Hospital C

(n=1), e unicamente no período 2006-2007. No Hospital A não foi encontrado nenhum isolado produtor de CMY-2 apesar do maior número de bactérias investigadas.

No presente estudo não se detectaram isolados de *Proteus mirabilis* produtores de qAmpC, o que é corroborado pelo facto da presença de qAmpCs nesta espécie ter sido descrita em Portugal apenas em dois isolados clínicos (Manageiro *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2008). A nível mundial a frequência de qAmpCs em *Proteus mirabilis* também é relativamente baixa (Mata *et al.*, 2010), tendo-se detectado recentemente a integração de *bla*_{CMY-2} e *bla*_{DHA-1} no cromossoma desta espécie (Harada *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011). Nenhum isolado evidenciou ser produtor de enzimas do tipo CMY-1, FOX, MOX, ACC, ACT, MIR, LAT e CFE o que está de acordo com a sua baixa ocorrência verificada noutros estudos, tanto em Portugal (Manageiro *et al.*, 2011) como a nível mundial (Jacoby, 2009).

2. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE qAmpC

A pesquisa dos genes *bla*_{qAmpC} constitui o melhor método para detectar a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC, embora nem sempre a sua presença esteja associada a uma efectiva expressão (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). No entanto, como nem todos os laboratórios têm acesso a este tipo de metodologia, procurou-se também neste trabalho avaliar a capacidade de detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de qAmpC através de um método fenotípico. Actualmente não existem linhas de orientação específicas para a pesquisa de qAmpCs por métodos fenotípicos, por isso se decidiu avaliar a *performance* de um método de fácil execução e extensivamente estudado (teste do ácido borónico, PBA), aplicando-o à colecção em estudo, nomeadamente nos isolados com comportamento de resistência à cefoxitina e susceptibilidade intermédia ou resistência a oximinocefalosporinas e à associação amoxicilina-ácido clavulânico.

À semelhança do observado por Pitout *et al.* (2010), o teste PBA com cefotetan (CTT) demonstrou excelente sensibilidade (96%), no entanto, apresentou uma especificidade apenas moderada (71.8%). Esta especificidade dever-se-á em grande parte à presença de *E. coli* hiperprodutoras de AmpC cromossómica (n=7) entre os isolados analisados, dado que a hiperprodução de AmpC cromossómica não é

distinguível da produção de qAmpC através deste teste (Coudron, 2005). Por esta razão, alguns autores não têm incluído a espécie *E. coli* em estudos utilizando o ácido borónico para detecção de qAmpCs (Song *et al.*, 2007). Por outro lado, será necessário determinar a razão pela qual em alguns isolados de *K. pneumoniae* (n=3) e *K. oxytoca* (n=1) ocorreram resultados falsos positivos no teste PBA, situação também reportada por Lee *et al.* (2009), mas para a qual não avançaram uma explicação. Recentemente foi demonstrado que carbapenemases da classe A (β -lactamases com serina no centro activo), como as do tipo KPC, GES, entre outras, também são inibidas pelo ácido borónico, podendo constituir uma causa de resultados falsos positivos quando se pesquisa a expressão de enzimas qAmpC pelo teste PBA (Pasteran *et al.*, 2009; Tsakris *et al.*, 2009). Contudo estes quatro isolados demonstraram ser susceptíveis a todos os carbapenemos testados, não sendo por isso de excluir a presença de uma nova qAmpC. Os dois resultados falsos negativos foram observados em *E. coli* contendo *bla*_{DHA-1}, situação igualmente reportada por Lee *et al.* (2009), em *K. pneumoniae* (n=1) e *E. coli* (n=1).

Outras combinações cefalosporina-inibidor têm também sido usadas para a detecção da expressão de qAmpC, nomeadamente aquelas usando cefoxitina, ou cefotaxima, ou ceftazidima, ou cefpodoxima com PBA ou cloxacilina (outro agente inibidor das enzimas AmpC), como descrito em estudos recentes (Lee *et al.*, 2009; Mirelis *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2009; Yagi *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2010). Nestes estudos observaram-se diferentes valores de sensibilidade e especificidade, pelo que o uso simultâneo de várias combinações poderá ser vantajosa no aumento da especificidade e sensibilidade do teste.

De acordo com Mirelis *et al.* (2006), uma forma de distinguir isolados produtores de qAmpC consiste na observação da presença de colónias dispersas junto do limite da zona de inibição das cefalosporinas (cefoxitina, ceftazidima e cefotaxima) e aztreonamo, um traço fenotípico que parece ser apenas característico destes isolados (100% de sensibilidade e especificidade), uma vez que os isolados não produtores de qAmpC apresentam zonas de inibição perfeitamente delimitadas. Esta característica diferenciadora também foi observada frequentemente nos isolados produtores de qAmpC identificados no presente estudo, tanto quando se usou cefotetan (incluído no

teste PBA), como nos antibiogramas com cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, aztreonamo, e por vezes com cefepima. Deste modo, através da presença do traço fenotípico foi possível concluir que os dois isolados apresentando um resultado falso negativo com o teste PBA expressavam uma qAmpC, enquanto tal não se verificou num dos falsos positivos (*K. pneumoniae*). Nos restantes três isolados de *Klebsiella* spp. serão necessárias provas adicionais para confirmar esta hipótese.

A expressão de enzimas do tipo ACC não foi detectada nos isolados seleccionados (n=11) pelos testes de indução/sinergismo que permitiriam a sua detecção, nem em estudos anteriores realizados em Portugal (Ferreira *et al.*, 2009; Manageiro *et al.*, 2010). Estas enzimas apresentam muito baixa prevalência comparativamente com CMY-2 e DHA-1 (Mata *et al.*, 2010), e a sua distribuição geográfica tem-se revelado restrita a alguns países Europeus como Espanha, França e Irlanda e do Norte de África (Ktari *et al.*, 2009; Mammeri *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010; Roche *et al.*, 2008).

3. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E CO-PRODUÇÃO DE ESBLs EM ISOLADOS PRODUTORES DE qAmpC

Neste estudo os isolados produtores de qAmpC apresentaram resistência à cefoxitina (≤ 14 mm), e susceptibilidade intermédia ou resistência a oximinocefalosporinas e à associação amoxicilina-ácido clavulânico. Apesar de este fenótipo ser o mais comum entre isolados produtores de qAmpC, a observação de susceptibilidade intermédia à cefoxitina já foi descrita por Yamasaki *et al.* (2010) em estirpes de *E. coli*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis* expressando CMY-2.

Os isolados produtores de qAmpC apresentaram elevadas taxas de resistência à ceftazidima, cefotaxima, e aztreonamo (94%, 88% e 84%, respectivamente), o que é consistente com os perfis de susceptibilidade descritos em isolados produtores de DHA-1 e CMY-2 (Jacoby, 2009). Por outro lado, a co-produção de ESBLs (82%) foi superior à verificada em outros estudos (Tabela 10), observando-se apenas entre os isolados produtores de DHA-1 (87%). Song *et al.* (2006), numa colecção também constituída maioritariamente por isolados produtores de DHA-1, obteve uma elevada taxa de resistência à ceftazidima (76%), contudo as taxas de resistência à cefotaxima e

ao aztreonamo foram significativamente inferiores (48% e 37%, respectivamente) e a co-produção de ESBLs foi apenas de 8.7% (Tabela 10). Na China, Li *et al.* (2008) observaram que 67% (27/41) dos isolados produtores de DHA-1 também expressavam uma ESBL, contudo essa taxa foi ainda superior nos isolados produtores de CMY-2 (77%, 10/13). Em Espanha, Mata *et al.* (2010) reportaram a co-produção de ESBLs em apenas 6% (7/117) numa colecção incluindo isolados produtores de CMY-2 (67%) e DHA-1 (26%).

A co-produção de DHA-1 e de ESBLs do tipo SHV-12 e de outras variantes do tipo SHV foi a combinação mais frequentemente detectada em *K. pneumoniae* (76%, 31/41) e *K. oxytoca* (100%, 4/4), o que também já foi verificado noutros estudos, nomeadamente na Coreia do Sul e no Japão (Li *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2009). Em Portugal SHV-12 também tem sido frequentemente reportada (Machado *et al.*, 2007). OXA-1 foi outra das β -lactamases detectadas nos isolados produtores de DHA-1 (60%, 28/47) [*K. pneumoniae*, 61% (25/41); *K. oxytoca*, 25% (1/4); *E. coli*, 100% (2/2)]. A descrição da co-produção de OXA-1 e DHA-1 tem sido raramente reportada. No entanto, já foi descrita a localização de *bla*_{OXA-1} e *bla*_{DHA-1} em integrões compostos inseridos em plasmídeos em *K. pneumoniae* (pRBDHA, número de acesso *GenBank* AJ971343/Verdet *et al.*, 2006; pNMDHA, número de acesso *GenBank* GU943791; estirpe C1911, número de acesso *GenBank* GU906294). Em onze isolados contendo *bla*_{DHA-1} e *bla*_{SHV-12} (*K. pneumoniae*, n=8; *K. oxytoca*, n=3), cinco possuíam adicionalmente o gene *bla*_{OXA-1} (todos *K. pneumoniae*), um genótipo que se descreve pela primeira vez a nível mundial nesta espécie. Outros autores têm detectado ainda, embora em menor percentagem relativamente a SHV-12, a presença de ESBLs do tipo CTX-M-14 e CTX-M-15 em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de DHA-1 (Cuzon *et al.*, 2010; Diestra *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2009; Yum *et al.*, 2005), mas sem a associação a OXA-1. Contudo, Menezes *et al.* (2010) reportaram em *Salmonella* spp. a presença simultânea de β -lactamases do tipo CTX-M-15, OXA-1, SHV-12 e DHA-1. Neste estudo, detectou-se um isolado de *E. coli* co-produtor de β -lactamases do tipo SHV, CTX-M-32, OXA-1 e DHA-1.

Neste estudo, e em função do conhecimento disponível, relatam-se pela primeira vez em espécies de *Enterobacteriaceae* as seguintes associações de genes que codificam para β -lactamases: $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-5}+bla_{TEM-1b}$ (n=4), $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-12}+bla_{TEM-1b}$ (n=3) e $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-90}+bla_{TEM-1b}$ (n=6) em *K. pneumoniae*; $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-12}+bla_{TEM-1b}$ (n=1), $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-tipo}+bla_{OXA-1}$ (n=1) e $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-12}$ (n=2) em *K. oxytoca*; $bla_{DHA-1}+bla_{CTX-M-32}+bla_{SHV-tipo}+bla_{OXA-1}$ (n=1) e $bla_{DHA-1}+bla_{SHV-tipo}+bla_{OXA-1}$ (n=1) em *E. coli*.

A resistência verificada à cefepima foi apenas de 8% (4/50). Song *et al.* (2006) obtiveram uma taxa de resistência ainda mais baixa (2%). Estes resultados contrastam com as elevadas percentagens de resistência observadas noutros estudos, nomeadamente, 46% (Li *et al.*, 2008), 60% (Singtohin *et al.*, 2010) e 83% (Ding *et al.*, 2008) (Tabela 10). Estes dados colocam em causa o uso terapêutico da cefepima em infecções por bactérias produtoras de qAmpC. O mecanismo de resistência à cefepima nestas bactérias deverá ser elucidado. No entanto, sabe-se que a cefepima é um substrato preferencial de várias oxacilinas, incluindo OXA-1 (Antunes *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2001). De facto, o gene bla_{OXA-1} foi detectado em 75% (3/4; *K. pneumoniae*, n=2; *E. coli*, n=1) dos isolados resistentes à cefepima identificados neste estudo. Beceiro *et al.* (2011) demonstraram recentemente que a força dos promotores de bla_{OXA-1} pode condicionar a sua expressão, e consequente resistência à cefepima. A resistência à cefepima no único isolado desprovido de bla_{OXA-1} poderá estar associada à hiperprodução da β -lactamase K1, dado tratar-se de uma *K. oxytoca* (Potsch *et al.*, 2004).

Globalmente, entre os antibióticos β -lactâmicos os carbapenemos foram os mais eficazes frente aos isolados produtores de qAmpC, não se verificando resistência ao meropenemo e observando-se uma taxa de resistência de 4% ao imipenemo (*K. pneumoniae*, n=1; *K. oxytoca*, n=1), que poderá estar associada a alterações de permeabilidade, mais especificamente nos canais de porina (Chen *et al.*, 2009; García-Fernández *et al.*, 2010) e/ou à produção de carbapenemases (Chen *et al.*, 2009). Em Portugal a ocorrência de carbapenemases em espécies da família *Enterobacteriaceae* é rara ao contrário do que se verifica em *Pseudomonas* spp. (Pena *et al.*, 2008; Quinteira *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010). Na generalidade dos estudos envolvendo isolados produtores de qAmpC, usualmente a susceptibilidade reportada ao imipenemo é

aproximadamente de 100% (Singtohin *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2006; Woodford *et al.*, 2007) (Tabela 10), razão pela qual dentro da classe dos β -lactâmicos, os carbapenemos constituem a principal escolha terapêutica para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de qAmpC.

As elevadas taxas de resistência a antibióticos não- β -lactâmicos (globalmente superiores a 70%) verificadas entre os isolados produtores de qAmpC incluídas no presente estudo, são especialmente relevantes no caso dos aminoglicosídeos e das quinolonas, que habitualmente constituem uma alternativa terapêutica aos β -lactâmicos no tratamento de infecções por estas bactérias.

As percentagens de resistência observadas para a amicacina, gentamicina, tobramicina e canamicina (26%, 58%, 96% e 98%, respectivamente) são compatíveis com a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* (codificando uma enzima modificadora dos aminoglicosídeos, inactivando tobramicina, canamicina e gentamicina), o qual se detectou em 90% (45/50) dos isolados. A proteína funcional deste gene deriva da substituição do aminoácido Leucina por Serina na posição 119 da proteína AAC(6')-Ib, resultando na perda de resistência à amicacina e aquisição de resistência à gentamicina (Casin *et al.*, 2003). No entanto, outros mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos deverão estar envolvidos, uma vez que se observou resistência à tobramicina e à gentamicina em dois isolados que não continham o gene *aac(6')-Ib-cr*. De facto, a caracterização de integrões de classe 1 revelou a presença do gene *aac(6')-IIc* (conferindo resistência à tobramicina, gentamicina e netilmicina, mas não à amicacina), mas num isolado de *K. oxytoca* contendo também *aac(6')-Ib-cr*, pelo que estudos futuros serão necessários para esclarecer estes casos. A resistência à estreptomicina (84%) poderá estar também relacionada com a presença de integrões de classe 1 contendo o gene *aadA2*, situação que foi confirmada em 3 isolados de *K. pneumoniae*.

Poucos estudos têm reportado a resistência a aminoglicosídeos em bactérias produtoras de qAmpC. Ainda assim, para o caso da amicacina, foram observadas percentagens de resistência similares nos estudos de Ding *et al.* (2008) e Rajni *et al.* (2008) (20% e 39%, respectivamente). Singtohin *et al.* (2010) reportaram em isolados produtores de qAmpC desprovidos de outros tipos de β -lactamases uma sensibilidade

aproximadamente de 100% à amicacina e netilmicina. Quanto à tobramicina e canamicina, Mata *et al.* (2010) observaram também percentagens de resistência significativamente inferiores às deste estudo (Tabela 10).

A elevada percentagem de resistência à ciprofloxacina (82%) encontrada entre os isolados produtores de qAmpC foi equivalente à de outros estudos (Tabela 10), verificando-se que 95% (39/41) dos isolados resistentes à ciprofloxacina possuíam o gene *qnrB4*. No entanto, este gene confere apenas susceptibilidade reduzida às fluoroquinolonas (Cattoir *et al.*, 2007). Adicionalmente, verificou-se a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* em 90% (37/41) dos isolados resistentes à ciprofloxacina, o qual também confere apenas susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina e à norfloxacin (Cattoir e Nordmann, 2009). A transferência conjunta de *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{CTX-M-14}*, *qnrB4* e *bla_{DHA-1}*, por conjugação, foi verificada por Yang *et al.* (2008) em *K. pneumoniae*. Outros mecanismos poderão estar também implicados no comportamento de resistência à ciprofloxacina observado nestes isolados, nomeadamente mutações nos genes *gyrA* e *parC*, que codificam para a DNA girase e a topoisomerase IV, respectivamente (Namboodiri *et al.*, 2011), mas que não foram investigados neste trabalho.

Quanto à tigeciclina, um antibiótico com utilização promissora em infecções por *Enterobacteriaceae* resistentes a múltiplos agentes antibacterianos, a taxa de resistência foi de 8% (4/50), sendo de destacar que ocorreu apenas em *Klebsiella* spp.. Estes resultados estão de acordo com os mais recentes estudos de susceptibilidade em *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBLs e qAmpCs, que indicam uma sensibilidade à tigeciclina superior a 97% (Jones *et al.*, 2009; Simner *et al.*, 2011).

Globalmente, verificou-se que todos os isolados produtores de qAmpC da colecção em estudo apresentaram resistência múltipla (resistência a 3 ou mais classes de antibióticos), verificando-se co-resistência a um mínimo de três classes e a um máximo de oito, sendo que em média cada isolado foi resistente a 6 classes de antibióticos, o que comprova a resistência a múltiplos agentes antibacterianos característica dos isolados produtores de qAmpC (Ding *et al.* 2008; Mataseje *et al.*, 2009a). No entanto, num estudo Norueguês envolvendo maioritariamente isolados de *E. coli* produtores de CMY-2 (92%), a taxa de resistência múltipla foi bastante inferior (58%) (Naseer *et al.*,

Tabela 10. Comparação entre as taxas de resistência a alguns antibióticos encontradas neste estudo e as descritas em outros trabalhos semelhantes.

Antibiótico	Resistência aos antibióticos (%)					
	Este estudo	Estudo A [#]	Estudo B [*]	Estudo C [‡]	Estudo D [†]	Estudo E [§]
Ceftazidima	94	76	74	60	---	99
Cefotaxima	88	48	87	90	---	96
Aztreonamo	84	37	---	---	---	95
Cefepima	8	2	46	60	---	83
Imipenemo	4	0	2	0	---	0
Amicacina	26	---	---	---	---	39
Tobramicina	96	---	---	---	34	---
Canamicina	98	---	---	---	44	---
Gentamicina	58	---	---	---	37	74
Ciprofloxacina	82	---	---	80-90	51	76

[#]Song *et al.*, (2006), Hosp. Universitário, Coreia do Sul - *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *P. mirabilis*; DHA-1 (93%, 43/46), CMY-2 (2%, 1/46); Co-produção de ESBLs – 9%; ^{*}Li *et al.*, (2008), Hosp. Universitário, China - *Klebsiella* spp., e *E. coli*; DHA-1 (76%, 41/54), CMY-2 (24%, 13/54); Co-produção de ESBLs – 69%; [‡]Singtohin *et al.*, (2010), Hosp. Universitário, Tailândia – *K. pneumoniae* e *E. coli*; CMY-2 (88%, 46/52), DHA-1 (2%, 1/52); Co-produção de ESBLs – 29%; Resultados de resistência aos antibióticos apenas de isolados co-produtores de ESBLs e qAmpC; [†]Mata *et al.*, (2010), Hospital, Espanha - *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. enterica*; CMY-2 (67%, 78/117), DHA-1 (26%, 30/117); Co-produção de ESBLs – 6%; [§]Ding *et al.*, (2008), 5 Hospitais, China – *K. pneumoniae* e *E. coli*; DHA-1 (93%, 69/74), CMY-2 (7%, 5/74); Co-produção de ESBLs – 24%.

2010). Apesar da diferença substancial entre os estudos, não se podem retirar conclusões quanto a uma maior associação de resistência múltipla a determinados tipos de qAmpC produzidos em algumas espécies bacterianas, uma vez que outros factores poderão estar em jogo, nomeadamente o consumo de antibióticos em determinada região/instituição de saúde e a composição em genes de resistência do metagenoma local.

Este estudo caracterizou-se ainda pela grande diversidade de perfis de resistência múltipla (31 no total). No entanto, um dos perfis (que incluía resistência à tobramicina, canamicina, estreptomina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, sulfonamidas, trimetoprim, e cloranfenicol), foi observado em isolados de *K. pneumoniae* (n=3) pertencentes ao clone epidémico ST11 identificado nos hospitais A, B e C. Contudo, apenas os isolados obtidos dos hospitais A e B apresentavam o mesmo perfil de conteúdo plasmídico (um plasmídeo de 50 kb associado a *bla*_{DHA-1}) e de replicões (IncFIIIs-IncFIIk-IncR), não sendo co-produtores de ESBLs. Estes dados sugerem que uma estirpe idêntica (com idêntico conteúdo plasmídico) poderá estar a disseminar-se entre bactérias destes hospitais. Por outro lado, em isolados de *K. pneumoniae* (n=7, clone ST11) e *K. oxytoca* (n=1, clone KoB) identificados no Hospital A, foi observado

um perfil igual ao anterior mas incluindo também resistência à tetraciclina. Os isolados do clone ST11 apresentavam um perfil de replicões similar (incluindo IncFIIIs-IncFIIk-IncR) mas diferente conteúdo plasmídico (número e tamanho) e de ESBLs. Contudo, em seis destes isolados foram detectados plasmídeos de 50 kb associados a *bla*_{DHA-1}, dos quais cinco continham ainda plasmídeos de 190 kb. Estes dados demonstram a importância do clone ST11 na disseminação de *bla*_{DHA-1} no Hospital A.

4. CONTRIBUIÇÃO DE CLONES E DE ELEMENTOS GENÉTICOS TRANSFERÍVEIS NA DISPERSÃO DE *bla*_{qAmpC}

4.1. *bla*_{DHA-1}

Entre os isolados produtores de DHA-1 verificou-se a existência de uma grande diversidade clonal, sobretudo em *K. pneumoniae* (12 clones, 41 isolados), confirmada também pela diversidade de STs identificados entre isolados representativos de tipos de PFGE (4/6). A maioria dos clones foi observada uma única vez, sendo que a disseminação observada para os restantes ocorreu num curto período de tempo, exceptuando os clones KpB (2 anos) e ST11 (tipo de PFGE designado de KpF) (3 anos). Curiosamente, o único clone detectado em mais do que um hospital pertence a uma linhagem clonal internacionalmente disseminada, a ST11 (Kristóf *et al.*, 2010), que tem sido predominantemente associada a *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} (Lee *et al.*, 2011) e *bla*_{KPC-2} (Andrade *et al.*, 2011). Contudo, o clone ST11 foi identificado recentemente na República Checa em isolados de *K. pneumoniae* produtores de DHA-1, expressando simultaneamente SHV-5 (Chudácková *et al.*, 2010), associação que é descrita no presente estudo pela segunda vez. Por outro lado, o clone ST443 (identificado em isolados de *K. pneumoniae* apresentando o tipo de PFGE designado de KpA) não constitui um clone epidémico, tendo sido apenas recentemente associado à disseminação de *bla*_{KPC-2} no Brasil (Seki *et al.*, 2011). Neste estudo reporta-se portanto a primeira associação de ST443 a *bla*_{DHA-1}. Os tipos de PFGE KpB e KpE estão relacionados com novos STs, embora seja ainda necessário solicitar a sua designação, dado apresentarem uma nova combinação de alelos ainda não encontradas na base de dados ou novas sequências de alelos que compõem uma nova combinação do esquema de MLST, respectivamente.

Apesar da grande diversidade de clones de *K. pneumoniae* produtores de DHA-1, dois foram predominantes: KpB (n=14) e ST11 (n=14). KpB foi responsável por um surto no Hospital A, atingindo diversas enfermarias entre 2003 e 2004, partilhando algumas similaridades genéticas com os clones KpK e KpL, nomeadamente a produção de ESBLs do tipo SHV (-5, -12, -90), e a ausência de genes *bla_{OXA-1}*, *catB3* e *arr-3*. Um perfil de resistência múltipla similar foi encontrado nos clones KpB e KpL (canamicina, tobramicina, estreptomicina, gentamicina, netilmicina, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol). Vários perfis de replicões ocorreram nos clones KpB, KpK e KpL, sendo comum a presença simultânea de IncFIIk e IncHI2 (n=14/16). Nestes isolados o conteúdo plasmídico foi diversificado e apenas ocorreu hibridação de *bla_{DHA-1}* em plasmídeos de 40 e 50 kb, respectivamente. Apesar de ainda não se terem efectuado os estudos de hibridação, plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncFIIk poderão estar associados a *bla_{DHA-1}*, dado que não ocorreu sinal de hibridação com sondas IncFIIs ou IncHI2 nos mesmos plasmídeos contendo *bla_{DHA-1}*.

O clone epidémico identificado como ST11, ocorreu, como anteriormente referido, em três dos hospitais incluídos no estudo (A, B e C), durante o período 2006-2008, possuindo como característica principal a presença simultânea de vários genes [*Int11*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*, *arr-3*, *sul1*, *ISCR1*, *qnrB4*, *IS26*] que parecem estar localizados no ambiente genético de *bla_{DHA-1}*. Esta característica é partilhada com isolados pertencentes aos clones KpA (ST443), KpC, KpD, KpE, KpH, KpI, KpJ, KoB e EcD, mas não com KpB. Com a excepção de alguns isolados pertencentes ao clone ST11 e KoB, os perfis de co-resistência a antibióticos não- β -lactâmicos foram muito diversos. Os perfis de replicões também foram algo heterogéneos, apesar de todos os isolados do clone ST11, KpH, KpI, KpJ, KoB e EcD apresentarem IncR (n=22). No clone ST11 e KpJ o gene *bla_{DHA-1}* foi encontrado em plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncR de 50 kb, sendo também esta localização possível no clone KpH (plasmídeo de 50 kb). No clone ST443 o gene *bla_{DHA-1}* foi detectado num plasmídeo IncR de 180 kb. Por outro lado, foram ainda detectados frequentemente plasmídeos de 190 kb nos clones ST11 e KpE contendo replicões IncFIIk. Neste último não se detectou IncR e não ocorreu sinal de hibridação com sondas IncFIIs ou IncHI2. Coelho *et al.* (2010) detectaram *bla_{CTX-M-15}* em plasmídeos IncFIIk com o mesmo tamanho

similar (190 kb), pelo que não é de excluir a presença de *bla*_{DHA-1} em plasmídeos IncFIIk no clone KpE. Em isolados do clone KpE (n=1) e ST11 (n=1) foram ainda detectados plasmídeos de 40 kb, mas nos quais não se detectou hibridação de *bla*_{DHA-1}. Contudo, dado o tamanho ser similar (40 kb) ao do plasmídeo do clone KpB hibridando com *bla*_{DHA-1} contendo apenas replicões IncHI2 e IncFIIk, poderão estar envolvidos plasmídeos IncFIIk. No clone KpD também se identificou o replicão IncFIIk, no entanto não se observou conteúdo plasmídico nem ocorreu sinal nas hibridações efectuadas.

A associação de *bla*_{DHA-1} a plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncR, assim como aos clones ST11 e ST443 é descrita pela primeira vez a nível mundial no presente estudo. Estes plasmídeos incluem-se naqueles que apresentam uma gama estreita de hospedeiros, sendo detectados em *Enterobacteriaceae* (Suzuki *et al.*, 2010). A literatura incluindo a epidemiologia de plasmídeos IncR é ainda escassa, no entanto, nos estudos disponíveis, tem-se verificado a sua importância na disseminação de mecanismos de resistência às quinolonas, nomeadamente genes *qnrB*, *qnrS1* e ainda *aac(6')-Ib-cr* (Coelho *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2009; Hordijk *et al.*, 2011), o que é consistente com os resultados preliminares deste trabalho. A investigação de Coelho *et al.* (2010) em isolados de *K. pneumoniae* num hospital de Barcelona, revelou também a presença do gene *bla*_{CTX-M-15} em plasmídeos IncR, cujos tamanhos variavam entre os 55-90 kb, sendo em alguns casos conjugativos e noutros não transferíveis (apenas se conseguindo a transferência por transformação). Outros genes codificando para β -lactamases como *bla*_{SHV-2a} e *bla*_{SHV-5} também já foram detectados em plasmídeos conjugativos IncR de 94 kb em *Klebsiella* spp. (Damjanova *et al.*, 2010). Por outro lado, Hordijk *et al.* (2011) num isolado de *E. coli* contendo um plasmídeo IncR (40 kb) codificando o gene *qnrB19* não observou a sua transferência por conjugação, à semelhança do verificado no presente estudo. Contudo os pesos moleculares observados são compatíveis com plasmídeos conjugativos, pelo que a sua não transferência nos ensaios de conjugação realizados pode estar relacionado com a perda de genes *Tra* (Smillie *et al.*, 2010). As sequências de IncR obtidas apresentam elevada homologia com o replicão do plasmídeo pK245 de *K. pneumoniae*, o qual se pensa derivar do replicão β do plasmídeo IncFII pGSH500 de *K. pneumoniae* (96% de similaridade entre as sequências proteicas das replicases) (Coelho *et al.*, 2010).

No único isolado representante do clone KpC não se detectaram plasmídeos, nem pela técnica de S1-PFGE nem por PCR, podendo estar-se na presença de um plasmídeo não tipável. Esta situação deve ser esclarecida, pois também pode configurar a integração de *bla*_{DHA-1} no cromossoma de *K. pneumoniae*, situação recentemente descrita em *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (Mata *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). Este fenómeno não é exclusivo das qAmpC, tendo sido já descrito para outras β -lactamases usualmente de localização plasmídica como as do tipo CTX-M (ex: CTX-M-14, -15) em *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (Coelho *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011). Contudo, o teste de sinergismo para detecção de ESBLs foi positivo e detectaram-se genes *bla*_{SHV}, que usualmente estão localizados em plasmídeos. No entanto, a integração cromossomal de *bla*_{SHV-38} já foi descrita (Poirel *et al.*, 2003; Tolentino *et al.*, 2011).

Em *K. oxytoca* apenas se detectaram 2 clones (4 isolados), um dos quais (KoA) envolvido num surto na Unidade de Nefrologia do Hospital A, no período 2003-2004. Nos isolados do clone KoA foi detectado apenas o replicão HI2 (n=3), ocorrendo hibridação algo ténue com sonda *bla*_{DHA-1}, apenas num dos isolados, em plasmídeo IncHI2 de aproximadamente 300 kb, no qual também poderá estar localizado *bla*_{SHV-12}. Estudos futuros serão efectuados para esclarecer estes casos. No clone KoB estabeleceu-se a associação de *bla*_{DHA-1} a um plasmídeo de cerca de 80 kb, contudo não se pode inferir qual o tipo de replicão envolvido, uma vez que para os grupos de incompatibilidade detectados (IncFII, IncP e IncR) existem descritos na literatura tamanhos plasmídicos similares (Coelho *et al.*, 2010; Novais *et al.*, 2006). Por outro lado, não se efectuaram hibridações com sondas IncFII e IncP, enquanto a hibridação com sondas IncR terá de ser repetida. Recentemente, Mata *et al.* (2010a) reportaram a presença de *bla*_{DHA-1} em *K. oxytoca* em plasmídeos de 70 kb, mas do tipo IncL/M.

Os isolados de *E. coli* contendo *bla*_{DHA-1} pertencem aos grupos filogenéticos B1, mais associado a estirpes comensais e de baixa virulência, e B2, mais associado a estirpes causadoras de infecções extraintestinais. Os clones identificados como B1-ST1196 e B2-*fumC24* apresentaram um perfil genético similar, e em ambos se identificaram replicões IncFII, IncFIB e IncR, sendo variável a presença de IncI e IncHI2. No entanto, o conteúdo plasmídico e as co-resistências a antibióticos não- β -lactâmicos foram diferentes. No clone B1-ST1196, o gene *bla*_{DHA-1} foi detectado num

plasmídeo InCHI2 de cerca de 350 kb, cuja sequência apresenta elevada homologia com o replicão do plasmídeo pEC-IMPQ de *K. pneumoniae*, mas também neste caso o sinal de hibridação foi algo ténue. Estudos futuros serão necessários para determinar a localização de *bla*_{DHA-1} no clone B2-*fumC24*.

Os plasmídeos do tipo InCHI2 apresentam uma gama estreita de hospedeiros, sendo detectados em *Enterobacteriaceae* (Suzuki *et al.*, 2010). Estes plasmídeos têm sido associados à disseminação de ESBLs, predominantemente do tipo CTX-M-9 em *E. coli* e *Salmonella* spp. (Novais *et al.*, 2006; Pardos de la Gándara *et al.*, 2011), e mais raramente de SHV-12 em *K. pneumoniae* (Elhani *et al.*, 2010), descrevendo-se neste estudo pela primeira vez a sua associação a *bla*_{DHA-1}. Os tamanhos plasmídicos observados são comparáveis aos descritos na literatura (Novais *et al.*, 2006), sendo estes plasmídeos usualmente conjugativos (Herrera-Léon *et al.*, 2011; Novais *et al.*, 2006; Pardos de la Gándara *et al.*, 2011), ao contrário do verificado neste estudo.

Na Figura 12A já foram apresentados os dados preliminares do ambiente genético que poderá existir em torno de *bla*_{DHA-1}, tendo em conta o tamanho dos fragmentos amplificados, os quais foram obtidos em um isolado pertencente ao clone KoB. Este tipo de organização genética é semelhante à de In37, um integrão composto de classe 1 inicialmente descrito num isolado de *E. coli* na China (Wang *et al.*, 2003; número de acesso *GenBank* AY259086). Este integrão apresenta uma região variável (rv-1) composta pelos genes *aac(6')-Ib-cr*, *bla*_{OXA-1}, *catB3* e *arr-3*, estando compreendida entre as sequências conservadas 5' (5'-CS) e 3' (3'-CS), enquanto a segunda região variável (rv-2) está localizada entre *ISCR1* (que surge justaposta à primeira cópia de 3'-CS) e uma segunda cópia de 3'-CS, e apresenta uma arquitetura aparentemente conservada em torno de genes *qnr*, que inclui a jusante a presença de *ampR*, o gene promotor de *ampC* que está ausente.

Nas regiões já sequenciadas observou-se 100% de identidade com o integrão InNMDHA (plasmídeo pNMDHA de *K. pneumoniae*, número de acesso *GenBank* GU943791), cuja rv-2 apresenta uma arquitetura aparentemente conservada em torno de genes *qnrB* (*qnrB4*), com a presença a montante do operão *sap* (*peptide transport system*) e a jusante do operão *psp* (*phage shock protein*), seguido de *bla*_{DHA-1} e do gene

promotor *ampR*, estando compreendida entre *ISCR1* e a segunda cópia de 3'-CS. De referir que a jusante do integrão InNMDHA se encontra uma cópia da sequência de inserção *IS6100*, a qual também foi detectada junto a In37 e a InRBDHA (número de acesso *GenBank* AJ971343) (Verdet *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003), mas que não foi pesquisada no presente estudo. Por outro lado, *ISCR1*, que usualmente participa na mobilização por transposição de vários genes de resistência para integrões de classe 1, incluindo *bla_{DHA-1}* (Verdet *et al.*, 2006), foi detectada em 98% dos isolados (n=46/47), o que reforça a possibilidade de um ambiente genético similar ao clone KoB nos isolados em que se identificou o perfil de genes mais completo [*Int11*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*, *arr-3*, *sull*, *ISCR1*, *qnrB4* e *IS26*]. A sequência de inserção *IS26* que vários autores propuseram ser capaz de mobilizar genes *bla_{qAmpC}* (Doloy *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2004), foi detectada em todos os isolados contendo *bla_{DHA-1}*, contudo, estudos suplementares serão necessários para verificar se a mesma faz parte do ambiente genético de *bla_{DHA-1}* nestes isolados. Verdet *et al.* (2006) demonstraram a presença de *IS26* flanqueando integrões compostos de classe 1 contendo *bla_{DHA-1}* em diferentes plasmídeos (pMPDHA e pTN60013), mas no caso de pTN60013 uma segunda cópia de *IS26* foi detectada dentro do integrão, o que sugere a presença de um transposão composto, situação também descrita por Mata *et al.* (2011a).

De acordo com os resultados obtidos até ao momento, a epidemiologia de genes *bla_{DHA-1}* parece ser bastante complexa, sugerindo que a sua disseminação envolve a dispersão clonal assim como fenómenos de transferência plasmídica, dada a diversidade de clones e espécies presentes contendo perfis de replicões e tamanhos comuns. Demonstrou-se o envolvimento de plasmídeos IncR de 50 e 180 kb, assim como de plasmídeos IncHI2 de 300 e 350 kb. Estudos futuros serão necessários para comprovar o envolvimento de integrões de classe 1 e sequências de inserção do tipo *ISCR1* e *IS26*.

4.2. *bla_{CMY-2}*

Os isolados de *E. coli* produtores de CMY-2 foram identificados no Hospital B (n=2) e no Hospital C (n=1), que são muito próximos geograficamente, e entre os quais circulam por vezes os mesmos doentes e profissionais, mas apesar disso não se verificou haver relação clonal entre eles. Estes isolados pertenciam ao grupo filogenético B1, mais associado a estirpes comensais e de baixa virulência, no entanto,

outros estudos têm relatado a presença de *bla*_{CMY-2} em isolados de todos os grupos filogenéticos (Baudry *et al.*, 2010; Naseer *et al.*, 2010). O clone ST101 identificado no isolado exibindo o tipo de PFGE designado de EcC, tem sido associado à disseminação de *bla*_{CTX-M-14} (Mora *et al.*, 2011) e também de *bla*_{NDM-1} (Mushtaq *et al.*, 2011), mas nunca à disseminação de *bla*_{CMY-2}. No clone EcB apenas se sequenciou o alelo *fumC*, pelo que estudos futuros serão efectuados para se identificar o ST correspondente. Contudo, a variante alélica encontrada (*fumC65*) pertence ao perfil do clone ST162, o qual foi recentemente detectado em isolados clínicos contendo *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{SHV-12} (Coelho *et al.*, 2011), mas nunca em isolados contendo *bla*_{CMY-2}. Estudos futuros serão efectuados para identificar o ST do clone EcA, embora se espere diversidade, dada a diversidade de tipos de PFGE presentes.

Nos clones EcA e ST101 (tipo de PFGE EcC) o gene *bla*_{CMY-2} foi detectado em plasmídeos de 80 kb pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncK. As sequências dos replicões destes isolados demonstraram elevada homologia com as do plasmídeo pCT. Estes plasmídeos apresentam uma gama estreita de hospedeiros, sendo predominantemente conjugativos, à semelhança do observado no clone EcA, apresentando frequentemente tamanhos entre 80-94 kb, tendo sido associados à disseminação de *bla*_{CTX-M-14} e de *bla*_{CMY-2} (Baudry *et al.*, 2010; Cottell *et al.*, 2011; Valverde *et al.*, 2009).

No clone EcB, o gene *bla*_{CMY-2} foi detectado num plasmídeo de 150 kb pertencente ao grupo de incompatibilidade IncA/C₂. As sequências dos replicões demonstraram elevada homologia com as do plasmídeo p2039. Estes plasmídeos apresentam uma gama larga de hospedeiros e também são predominantemente conjugativos, embora neste estudo tal não se tenha verificado, o que poderá estar relacionado com a perda de genes *Tra* (Smillie *et al.*, 2010). O tamanho observado é compatível com o descrito na literatura (63-200 kb) e com o facto de serem conjugativos, tendo sido associados à disseminação de *bla*_{CTX-M-14} e de *bla*_{CMY-2} (Baudry *et al.*, 2010; Sirichote *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011; Valverde *et al.*, 2009).

Na Figura 12B já foram apresentados os dados preliminares para o ambiente genético existente em torno de *bla*_{CMY-2}, os quais foram obtidos no clone EcA. A sua associação ao gene *blc* (localizado a jusante) foi verificada em todos os isolados, que juntamente com o gene *sugE* (o qual não foi investigado) constitui a denominada região *C. freundii* (Verdet *et al.*, 2009). Também usual é a associação de *ISEcp1* a montante, que habitualmente está envolvida na mobilização e expressão de genes do tipo *bla*_{CMY-2} (D'Andrea *et al.*, 2011; Nakano *et al.*, 2007; Verdet *et al.*, 2009). Contudo, esta associação apenas se verificou no clone EcA, apesar do gene *ISEcp1* ter sido detectado também no clone EcB. Neste último isolado, estudos futuros com otimização das condições de amplificação serão efectuados para comprovar o resultado obtido. No caso do isolado pertencente ao clone EcC não se detectou a presença de *ISEcp1*, pelo que poderá estar presente um gene truncado como descrito por Antunes *et al.* (2010), o qual poderá ocorrer por exemplo devido à integração de outros elementos genéticos como sequências de inserção do tipo *IS10* ou *IS1294* (Verdet *et al.*, 2009). De modo a esclarecer este caso, serão efectuados estudos com novas estratégias de PCR *mapping*.

Os resultados obtidos até ao momento sugerem uma maior importância do envolvimento de plasmídeos conjugativos, mas também de sequências de inserção do tipo *ISEcp1* na disseminação de *bla*_{CMY-2}. Demonstrou-se o envolvimento de plasmídeos IncK de 80 kb, assim como de plasmídeos IncA/C₂ de 150 kb.

VI. CONCLUSÕES

O aumento da resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* constitui um importante problema de saúde pública à escala mundial, no qual as β -lactamases adquiridas do tipo AmpC também têm assumido um papel relevante. Adicionalmente, os isolados produtores de qAmpC apresentam frequentemente resistências múltiplas aos antibióticos, limitando a selecção de terapêutica antibiótica.

As conclusões obtidas do trabalho realizado nesta Tese são:

A detecção de isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* produtores de β -lactamases adquiridas do tipo AmpC (qAmpCs) através da combinação de um método de *screening* fenotípico (FOX^R, CEF^{I/R}, AMC^{I/R}) com o teste PBA apresenta elevada sensibilidade, mas algum comprometimento da especificidade, sobretudo em *E. coli*. A observação da presença ou ausência de colónias dispersas junto do limite da zona de inibição de certas cefalosporinas (cefotetan, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima e cefepima) e aztreonamo permite distinguir resultados falsos negativos e falsos positivos. Esta metodologia é fácil de implementar e apresenta potencial para ser incluída na rotina do laboratório de Microbiologia. Será contudo importante a confirmação molecular periódica dado o potencial de alteração das enzimas em circulação.

Entre as espécies de *Enterobacteriaceae* estudadas não produtoras de β -lactamases AmpC indutíveis, as qAmpCs foram observadas maioritariamente em *K. pneumoniae*, e mais raramente em *K. oxytoca* e *E. coli*, verificando-se contudo baixa diversidade, tendo sido detectados apenas os tipos DHA-1 e CMY-2. Estas encontram-se disseminadas em instituições de saúde Portuguesas pelo menos desde o ano de 2003.

A co-produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), predominantemente do tipo SHV, é comum entre os isolados produtores de qAmpC. A descrição de associações de genes *bla*_{qAmpC} e *bla*_{ESBL} nunca antes descritas configura uma situação epidemiológica mais complexa em Portugal. O perfil de resistência a múltiplos agentes

antibacterianos observado entre os isolados produtores de qAmpC é alarmante, restringindo as opções terapêuticas.

A epidemiologia de isolados produtores de qAmpCs em Portugal é complexa, parecendo envolver a disseminação de clones e/ou plasmídeos no caso de *bla*_{DHA-1}, e predominantemente plasmídeos, mas também sequências de inserção do tipo *ISEcp1* no caso de *bla*_{CMY-2}.

Estudos futuros de identificação e caracterização de isolados produtores de qAmpC e/ou genes *bla*_{qAmpC} noutros nichos ecológicos serão importantes de modo a estabelecer a extensão da sua disseminação e a eventual existência de um reservatório extra-hospitalar destas enzimas.

Os surtos detectados no Hospital A reforçam a importância da realização destes estudos para uma eficaz política de controlo de infecção.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, H., Fenner, L., Walter, *et alli.* (2008). Plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), pp. 457–8.
- Ahmed, A. M., Shimamoto, T. (2008). Emergence of a cefepime- and ceftipime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC β -lactamase, CMY-37. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(3), pp. 256-61.
- Ahmed, A. M., Shimabukuro, H., Shimamoto, T. (2009). Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. *Journal of Food Science*, 74(7), pp. M405-10.
- Alvarez, M., Tran, J. H., Chow, N., *et alli.* (2004). Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), pp. 533–7.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 289, pp. 321–31.
- Andrade, L. N., Curiao, T., Ferreira, J. C., *et alli.* (2011). Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), pp. 3579-83.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., *et alli.* (2004). Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), pp. 429-34.
- Antunes, P., Coque, T. M., Peixe, L. (2010). Emergence of an IncI γ plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), pp. 2097-100.

- Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., *et alli.* (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), pp. 1615-20.
- Barlow, M., Hall, B. G. (2002). Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), pp. 1190-8.
- Barton, B. M., Harding, G. P., Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*, 226(2), pp. 235-40.
- Basak, S., Khodke, M., Bose, S., *et alli.* (2009). Inducible AmpC β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a rural hospital of central India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3, pp. 1921-7.
- Batchelor, M., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J., *et alli.* (2005). Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), pp. 2261-5.
- Baudry, P. J., Mataseje, L., Zhanel, G. G., *et alli.* (2009). Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC β -lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(4), pp. 379-83.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S. (1989). Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17, pp. 316–21.
- Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., *et alli.* (1997). A novel class C β -lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), pp. 2041-6.
- Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., *et alli.* (1999). A novel type of AmpC β -lactamase ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(8), pp. 1924–31.
- Beceiro, A., Maharjan, S., Gaulton, T., *et alli.* (2011). False extended-spectrum β -lactamase phenotype in clinical isolates of *Escherichia coli* associated with increased expression of OXA-1 or TEM-1 penicillinases and loss of porins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), pp. 2006-10.
- Beesley, T., Gascoyne, N., Knott-Hunziker, V., *et alli.* (1983) The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. *The Biochemical Journal*, 209, pp. 229-33.

- Bell, J. M., Chitsaz, M., Turnidge, J. D., *et alli.* (2007). Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), pp. 1478-82.
- Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, pp. 11–18.
- Bidet, P., Burghoffer, B., Gautier, V., *et alli.* (2005). In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), pp. 3562-5.
- β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [Em linha]. Disponível em <<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>>. [Consultado em 10/06/2011].
- Black, J. A., Moland, E. S., Thomson, K. S. (2005). AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), pp. 3110–3.
- Bou, G., Oliver, A., Ojeda, M., *et alli.* (2000). Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), pp. 2549-53.
- Brolund, A., Wisell, K. T., Edquist, P. J., *et alli.* (2010). Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), pp. 229-33.
- Brown, T. (2001). Southern Blotting. *Current Protocols in Protein Science*. A.4G.1–A.4G.8.
- Burman, L. G., Park, J. T., Lindström, E. B., *et alli.* (1973). Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: Identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. *Journal of Bacteriology*, 116(1), pp. 123-30.
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), pp. 1211–33.
- Bush, K., Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), pp. 969–76.

- Cantón, R., Coque, T. M., Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(4), pp. 315-25.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., *et alli.* (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1), pp. 144–53.
- Cantón, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl. 1), pp. 20-5.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., *et alli.* (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), pp. 219-28.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., *et alli.* (2005a). Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), pp. 833-5.
- Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (Suppl. 1), pp. 117–123.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), pp. 2227-38.
- Casin, I., Bordon, F., Bertin, P., *et alli.* (1998). Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), pp. 209-15.
- Cattoir, V., Weill, F-X., Poirel, L., *et alli.* (2007). Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, pp. 751–4.
- Cattoir, V., Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16(8), pp. 1028-46.
- Chen, L. R., Zhou, H. W., Cai, J. C., *et alli.* (2009). Combination of IMP-4 metallo-beta-lactamase production and porin deficiency causes carbapenem resistance in a *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(2), pp. 163-7.
- Chudácková, E., Bergerová, T., Fajfrlík, K., *et alli.* (2010). Carbapenem-nonsusceptible strains of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 and/or DHA-1 β -lactamases in a Czech hospital. *FEMS Microbiology Letters*, 309(1), pp. 62-70.

- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66(10), pp. 4555-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.
- Coelho, A., González-López, J. J., Miró, E., *et alli.* (2010). Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), pp. 73-8.
- Coelho, A., Mora, A., Mamani, R., *et alli.* (2011). Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), pp. 517-26.
- Colinon, C., Miriagou, V., Carattoli, A., *et alli.* (2007). Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), pp. 258-62.
- Corvec, S., Crémet, L., Caroff, N., *et alli.* (2009). *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate coproducing SHV-2a, DHA-1, QnrB4, and AAC(6')-Ib-cr determinants in France. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(4), pp. 462-3.
- Corvec, S., Crémet, L., Leprince, C., *et alli.* (2010). Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic β -lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), pp. 277-81.
- Cottell, J. L., Webber, M. A., Coldham, N. G., *et alli.* (2011). Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*_{CTX-M-14}. *Emerging Infectious Diseases*, 17(4), pp. 645-52.
- Coudron, P. E., Moland, E. S., Thomson, K. S. (2000). Occurrence and detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), pp. 1791-6.

- Coudron, P. E., Hanson, N. D., Climo, M. W. (2003). Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp. 772-7.
- Coudron, P. E. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp. 4163-7.
- Cuzon, G., Naas, T., Guibert, M., *et alli.* (2010). In vivo selection of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), pp. 265-8.
- Damjanova, I., Tóth, A., Pászti, J., *et alli.* (2007). Epidemiology of SHV-type β -lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(6), pp. 665-71.
- Damjanova, I., Tóth, A., Kardos, G., *et alli.* (2009). First detection of plasmid-mediated AmpC-type ACC-4 β -lactamase from *Proteus mirabilis* in Hungary. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl. 4), pp. S333.
- D'Andrea, M. M., Nucleo, E., Luzzaro, F., *et alli.* (2006). CMY-16, a novel acquired AmpC-type β -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), pp. 618-24.
- D'Andrea, M. M., Literacka, E., Zioga, A., *et alli.* (2011). Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), pp. 2735-42.
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp. 417-33.
- Decré, D., Verdet, C., Raskine, L., *et alli.* (2002). Characterization of CMY-type β -lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella* isolated in four hospitals in the Paris area. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), pp. 681-8.

- Deshpande, L. M., Jones, R. N., Fritsche, T. R., *et alli.* (2006). Occurrence of plasmidic AmpC type β -lactamase-mediated resistance in *Escherichia coli*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2004). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(6), pp. 578-81.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., *et alli.* (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp. 4178-82.
- Dias, D. (2009). Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogénicas de gram negativo. Tese de Mestrado. Lisboa.
- Diestra, K., Miró, E., Martí, C., *et alli.* (2011). Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), pp. 1032-6.
- Ding, H., Yang, Y., Lu, Q., *et alli.* (2008). The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(10), pp. 915-21.
- Doi, Y., Paterson, D. L. (2007). Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(3), pp. 191-7.
- Doi, Y., Paterson, D. L., Egea, P., *et alli.* (2010). Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), pp. 33-8.
- Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., *et alli.* (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), pp. 3332-5.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, 9(8), pp. 2322.
- Elhani, D., Bakir, L., Aouni, M., *et alli.* (2010). Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999-2005. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2), pp. 157-64.

- Empel, J., Baraniak, A., Literacka, E., *et alli.* (2008). Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), pp. 2449-54.
- Empel, J., Hrabák, J., Kozińska, A., *et alli.* (2010). DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. *Microbial Drug Resistance*, 16(4), pp. 291-5.
- EUCAST (2010). EUCAST Disk Diffusion Test for Routine Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org/eucast_disk_diffusion_test/breakpoints/>. [Consultado em 22/10/2010].
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2009). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13(4-5), pp. 132-8.
- Farmer, J. J. 3rd. (1999). *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. & Tenover, R. H., (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, pp. 442–58.
- Ferreira, S., Paradelo, A., Velez, J., *et alli.* (2009). Prevalence of ampC β -lactamase genes in *Enterobacteriaceae* clinical isolates from Aveiro, Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl. 4), pp. S333.
- Fisher, M. A., Stamper, P. D., Hujer, K. M., *et alli.* (2009). Performance of the Phoenix bacterial identification system compared with disc diffusion methods for identifying extended-spectrum β -lactamase, AmpC and KPC producers. *Journal of Medical Microbiology*, 58(6), pp. 774-8.
- Fluit, A. C., Jones, M. E., Schmitz, F. J., *et alli.* (2000). Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clinical Infectious Diseases*, 30(3), pp. 454-60.
- Fortineau, N., Poirel, L., Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(2), pp. 207-10.

- Frye, J. G., Fedorka-Cray, P. J. (2007). Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), pp. 134-42.
- Frye, J. G., Fedorka-Cray, P. J., Jackson, C. R., *et alli.* (2008). Analysis of *Salmonella enterica* with reduced susceptibility to the third-generation cephalosporin ceftriaxone isolated from U.S. cattle during 2000-2004. *Microbial Drug Resistance*, 14(4), pp. 251-8.
- Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B., *et alli.* (2004). The basis for resistance to β -Lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), pp. 40802–6.
- Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., *et alli.* (2011). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveillance*, 16(11), pii:19819.
- Gaillot, O., Clément, C., Simonet, M., *et alli.* (1997). Novel transferable β -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(1), pp. 85-7.
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., *et alli.* (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), pp. 274-81.
- García-Fernández, A., Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., *et alli.* (2010). An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), pp. 4178-84.
- Gautom, R. K. (1997). Rapid pulse-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in one day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), pp. 2977-80.
- Giamarellou, H. (2008). Beta-Lactams without a suicide inhibitor. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1), pp. 194-7.
- Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., *et alli.* (2000). Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), pp. 1470-8.

- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., *et alli.* (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 1–4.
- Goldstein, F. W. (2002). Cephalosporinase induction and cephalosporin resistance: a longstanding misinterpretation. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, pp. 823–5.
- Goossens, H., Ferech, M., Stichele, R. V., *et alli.* (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study for the ESAC Project Group. *Lancet*, 365, pp. 579–87.
- Haldorsen, B., Aasnaes, B., Dahl, K. H., *et alli.* (2008). The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired *ISEcp1*-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(4), pp. 694–702.
- Hammad, A. M., Ishida, Y., Shimamoto, T. (2009). Prevalence and molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from traditional Egyptian Domiati cheese. *Journal of Food Protection*, 72(3), pp. 624-30.
- Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., *et alli.* (2010). Chromosomally encoded *bla*_{CMY-2} located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), pp. 3545-50.
- Herrera-León, S., González-Sanz, R., Herrera-León, L., *et alii.* (2011). Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), pp. 287-90.
- Ho, P. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., *et alli.* (2011). Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One*, 6(3), pp. e17989.
- Hope, R., Pillana, T., James, D., *et alli.* (2010). Zone breakpoints, by the CLSI disc method, for 15 μ g tigecycline discs corresponding to EUCAST MIC breakpoints. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), pp. 2262-4.
- Hope, R., Warner, M., Potz, N. A., *et alli.* (2006). Activity of tigecycline against ESBL-producing and AmpC-hyperproducing *Enterobacteriaceae* from South-East England. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), pp. 1312-4.

- Hopkins, K. L., Liebana, E., Villa, L., *et alli.* (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), pp. 3203-6.
- Hordijk, J., Bosman, A. B., van Essen-Zandbergen, A., *et alli.* (2011). *qnrB19* gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), pp. 453-4.
- Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., *et alli.* (1994). Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed *bla*_{MOX-1} gene encoding AmpC-type β -lactamase. *Gene*, 139(1), pp. 93-8.
- Hu, F. P., Xu, X. G., Zhu, D. M., *et alli.* (2008). Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(3), pp. 320-4.
- Huang, I. F., Chiu, C. H., Wang, M. H., *et alli.* (2005). Outbreak of dysentery associated with ceftriaxone-resistant *Shigella sonnei*: First report of plasmid-mediated CMY-2-type AmpC β -lactamase resistance in *S. sonnei*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), pp. 2608-12.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., *et alli.* (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(4), pp. 340-2.
- Jacobs, C., Huang, L., Bartowsky, E., *et alli.* (1994). Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effector for β -lactamase induction. *The EMBO Journal*, 13, pp. 4684-94.
- Jacoby, G. A., Tran, J. (1999). Sequence of the MIR-1 β -lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), pp. 1759-60.
- Jacoby, G. A. (2006). Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), pp. 1123-9.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), pp. 161-82.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., *et alli.* (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*, 10(4), pp. 867-78.
- Jaurin, B., Grundström, T., Edlund, T., *et alli.* (1981). The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature*, 290, pp. 221-5.

- Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., *et alli.* (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), pp. 1003-6.
- Jones, C. H., Tuckman, M., Keeney, D., *et alli.* (2009). Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp. 465-75.
- Jørgensen, R. L., Nielsen, J. B., Friis-Møller, A., *et alli.* (2010). Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), pp. 460-4.
- Källman, O., Giske, C. G., Samuelsen, Ø., *et alli.* (2009). Interplay of efflux, impermeability, and AmpC activity contributes to cefuroxime resistance in clinical, non-ESBL-producing isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 15(2), pp. 91-5.
- Kaneko, K., Okamoto, R., Nakano, R., *et alli.* (2005). Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), pp. 2955–8.
- Kang, C. I., Pai, H., Kim, S. H., *et alli.* (2004). Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(6), pp. 1130-3.
- Kelesidis, T., Karageorgopoulos, D. E., Kelesidis, I., *et alli.* (2008). Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), pp. 895-904.
- Kern M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., *et alli.* (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, pp. 513–6.
- Kim, J., Kang, H. Y., Lee, Y. (2008). The identification of CTX-M-14, TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea. *Journal of Microbiology*, 46(5), pp. 478-81.

- Koeck, J. L., Arlet, G., Philippon, A., *et alli.* (1997). A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiology Letters*, 152, pp. 255-60.
- Kristóf, K., Tóth, A., Damjanova, I., *et alli.* (2010). Identification of a *bla*_{VIM-4} gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), pp. 1303-5.
- Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K. H., *et alli.* (2004). Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), pp. 4263-70.
- Ktari, S., Arlet, G., Mnif, B., *et alli.* (2006). Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo- β -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase, and CMY-4 AmpC β -lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), pp. 4198-201.
- Ktari, S., Arlet, G., Verdet, C., *et alli.* (2009). Molecular epidemiology and genetic environment of acquired *bla*_{ACC-1} in *Salmonella enterica* serotype Livingstone causing a large nosocomial outbreak in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 15(4), pp. 279-86.
- Kumar, A., Hajjar, E., Ruggerone, P., *et alli.* (2010). Structural and dynamical properties of the porins OmpF and OmpC: insights from molecular simulations. *Journal of Physics Condensed Matter*, 22(45), pp. 454125.
- Lee, S. H., Kim, J. Y., Lee, G. S., *et alli.* (2002). Characterization of *bla*_{CMY-11}, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase gene in a Korean clinical isolate of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2), pp. 269-73.
- Lee, J. H., Jung, H. I., Jung, J. H., *et alli.* (2004). Dissemination of transferable AmpC-type β -lactamase (CMY-10) in a Korean hospital. *Microbial Drug Resistance*, 10(3), pp. 224-30.
- Lee, K., Lee, M., Shin, J. H., *et alli.* (2006). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Microbial Drug Resistance*, 12(1), pp. 44-9.
- Lee, W., Jung, B., Hong, S. G., *et alii.* (2009). Comparison of 3 phenotypic-detection methods for identifying plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing

- Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* strains. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(5), pp. 448-54.
- Lee, M. Y., Ko, K. S., Kang, C. I., *et alli.* (2011). High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), pp. 160-3.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., *et alli.* (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), pp. 185–91.
- Li, W. C., Huang, F. Y., Liu, C. P., *et alli.* (2005). Ceftriaxone resistance of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in Northern Taiwan attributable to production of CTX-M-14 and CMY-2 β -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), pp. 3237-43.
- Li, X. M., Jang, S. J., Bae, I. K., *et alli.* (2010). Frequency of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* over a three-year period in a university hospital in Korea. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 30(6), pp. 616-623.
- Li, Y., Li, Q., Du, Y., *et alli.* (2008). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC β -lactamase resistance in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), pp. 1317–21.
- Literacka, E., Empel, J., Baraniak, A., *et alli.* (2004). Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), pp. 4136-43.
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36(S1), pp. S11–23.
- Livermore, D. M. (2003a). AmpC β -lactamases & their detection. [Em linha]. Disponível em <http://www.bsac.org.uk/_db/_downloads/AmpC_their_detection_Sheffield_DL.ppt #290,1, AmpC b-Lactamases & their detection >. [Consultado em 22/07/2010].
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (Suppl. 1), pp. 3-10.
- Luzzaro, F., Brigante, G., D'Andrea, M. M., *et alli.* (2009). Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type β -lactamase:

- epidemiology and clinical management. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), pp. 328-33.
- Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., *et alli.* (2009). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp. 519-24.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., *et alli.* (2004). Emergence of CTX-M β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring *bla*_{CTX-M-14}. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, pp. 755-7.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., *et alli.* (2005). Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), pp. 1823-9.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., *et alli.* (2007). High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1370-4.
- Machado, E., Gonçalves, T., Silva, R., *et alli.* (2009). Shift in ESBL-types produced by *Enterobacteriaceae* in a Portuguese hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl. 4), pp. S254.
- Machado, E., Amaral, S., Ferreira, R., *et alli.* (2009b). Emergence of CTX-M-28-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal. *In proceedings of the 3rd FEMS Congress of European Microbiologists*, Gothenburg.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., *et alli.* (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp. 71-6.
- Mammeri, H., Eb, F., Berkani, A., *et alli.* (2008). Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), pp. 498-503.
- Mammeri, H., Guillon, H., Eb, F., *et alli.* (2010). Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), pp. 4556-60.

- Manageiro, V., Jones-Dias, D., Domingues, G.A., *et alli.* (2010). Diversity of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC gene from Portuguese hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(Suppl. 2), pp. S184-5.
- Marchese, A., Arlet, G., Schito, G. C., *et alli.* (1998). Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), pp. 464-7.
- Marín, M., Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), pp. 42-55.
- Mata, C., Miró, E., Rivera, A., *et alli.* (2010). Prevalence of acquired AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(5), pp. 472-6.
- Mata, C., Miró, E., Mirelis, B., *et alli.* (2010a). Plasmids carrying AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital, 1999–2007. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(Suppl. 2), pp. S183.
- Mata, C., Weeks, J., Walsh, T., *et alli.* (2011). A novel ICE mobilising DHA-1 in NDM-1 harbouring clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella*. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(Suppl. 4), pp. S44.
- Mata, C., Miró, E., Toleman, M., *et alli.* (2011a). Association of *bla*(DHA-1) and *qnrB* genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of *Enterobacteriaceae* at a Spanish hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03539.x. [Epub ahead of print].
- Mataseje, L. F., Neumann, N., Crago, B., *et alli.* (2009). Characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), pp. 3126–30.
- Mataseje, L. F., Xiao, J., Kost, S., *et alli.* (2009a). Characterization of Canadian cefoxitin-resistant non-typhoidal *Salmonella* isolates, 2005-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(4), pp. 723-30.
- Mataseje, L. F., Baudry, P. J., Zhanel, G. G., *et alli.* (2010). Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(4), pp. 387-91.

- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., *et alli.* (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), pp. 1568-74.
- Mendonça, N. (2009). Molecular diversity of *bla* genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates. Tese de Doutorado. Lisboa.
- Menezes, G. A., Khan, M. A., Harish, B.N., *et alli.* (2010). Molecular characterization of antimicrobial resistance in non-typhoidal *salmonellae* associated with systemic manifestations from India. *Journal of Medical Microbiology*, 59(12), 1477-83.
- Migliavacca, R., Nucleo, E., D'Andrea, *et alli.* (2007). Acquired AmpC type β -lactamases: an emerging problem in Italian long-term care and rehabilitation facilities. *New Microbiologica*, 30(3), pp. 295-8.
- M'ikanatha, N. M., Sandt, C. H., Localio, A. R., *et alli.* (2010). Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(8), pp. 929-34.
- Minarini, L. A. R., Poirel, L., Cattoir, V., *et alli.* (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, pp. 474-8.
- Miriagou, V., Filip, R., Coman, G., *et alli.* (2002). Expanded-spectrum cephalosporin-resistant *salmonella* strains in Romania. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), pp. 4334-6.
- Miriagou, V., Tzouvelekis, L. S., Villa, L., *et alli.* (2004). CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), pp. 3172-4.
- Mirelis, B., Rivera, A., Miró, E., *et alli.* (2006). A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(6), pp. 370-2.
- Mocktar, C., Govinden, U., Sturm, A. W., *et alli.* (2008). CMY-20, a novel AmpC-type β -lactamase from South African clinical *Escherichia coli* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(4), pp. 405-8.
- Mora, A., Blanco, M., López, C., *et alli.* (2011). Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical

- isolates in Galicia, northwest Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(1), pp. 16-21.
- Mulvey, M. R., Bryce, E., Boyd, D. A., *et alli.* (2005). Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp. 358-65.
- Mushtaq, S., Irfan, S., Sarma, J. B., *et alli.* (2011). Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), pp. 2002-5.
- Naas, T., Aubert, D., Fortineau, N., *et alli.* (2002). Cloning and sequencing of the β -lactamase gene and surrounding DNA sequences of *Citrobacter braakii*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter werkmanii*, *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter cancerogenus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), pp. 81-7.
- Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., *et alli.* (2004). CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -Lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), pp. 1151-8.
- Nakano, R., Okamoto, R., Nagano, N., *et alli.* (2007). Resistance to gram-negative organisms due to high-level expression of plasmid-encoded ampC β -lactamase *bla*_{CMY-4} promoted by insertion sequence *ISEcp1*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13(1), pp. 18-23.
- Namboodiri, S. S., Opintan, J. A., Lijek, R. S., *et alli.* (2011). Quinolone resistance in *Escherichia coli* from Accra, Ghana. *BMC Microbiology*, 27, pp. 11:44.
- Naseer, U., Haldorsen, B., Simonsen, G. S., *et alli.* (2010). Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2), pp. 171-8.
- Nichol, K. A., Zhanel, G. G., Hoban, D. J. (2002). Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), pp. 3261-64.
- Nikaido H. (2003). Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 593-656.
- Nordmann, P., Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), pp. 321-31.
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., *et alli.* (2006). Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing *CRI* associated with

- defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), pp. 2741–50.
- Ogbolu, D. O., Daini, O. A., Ogunledun, A., *et alli.* (2011). High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(1), pp. 62-6.
- Ohana, S., Leflon, V., Ronco, E., *et alli.* (2005). Spread of a *Klebsiella pneumoniae* strain producing a plasmid-mediated ACC-1 AmpC β -lactamase in a teaching hospital admitting disabled patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), pp. 2095-7.
- Oteo, J., Cercenado, E., Cuevas, O., *et alli.* (2010). AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), pp. 270-6.
- Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., *et alli.* (2008). Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(6), pp. 534-7.
- Pages, J. M., Lavigne, J. P., Leflon-Guibout, V., *et alli.* (2009). Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One*, 4(3), pp. e4817.
- Pai, H., Kang, C. I., Byeon, J. H., *et alli.* (2004). Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), pp. 3720-8.
- Papagiannitsis, C. C., Giakkoupi, P., Vatopoulos, A. C., *et alli.* (2010). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* of a novel sequence type (ST383) producing VIM-4, KPC-2 and CMY-4 β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(6), pp. 573-4.
- Papagiannitsis, C. C., Tzouveleki, L. S., Tzelepi, E., *et alli.* (2007). Plasmid-encoded ACC-4, an extended-spectrum cephalosporinase variant from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), pp. 3763-7.
- Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., Jacoby, G. A. (1990). Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy

- β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), pp. 2200-9.
- Pardos de la Gándara, M., Seral, C., Castillo García, J., *et alli*. (2011). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001-2008). *Microbial Drug Resistance*, 17(2), pp. 207-13.
- Park, Y. J., Yu, J. K., Lee, S., *et alli*. (2007). Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(4), pp. 868-71.
- Park, Y. S., Yoo, S., Seo, M-R., *et alli*. (2009). Risk factors and clinical features of infections caused by plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, pp. 38–43.
- Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., *et alli*. (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp. 1631-9.
- Patel, M. H., Trivedi, G. R., Patel, S. M., *et alli*. (2010). Antibiotic susceptibility pattern in urinary isolates of gram negative bacilli with special reference to AmpC β -lactamase in a tertiary care hospital. *Urology Annals*, 2(1), pp. 7-11.
- Pavez, M., Neves, P., Dropa, M., *et alli*. (2008). Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 57(12), pp. 1590-2.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 538-82.
- Pena, A., Donato, A. M., Alves, A. F., *et alli*. (2008). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(12), pp. 1269-71.
- Pérez-Pérez, F. J., Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), pp. 2153–62.
- Petrosino, J. F., Pendleton, A. R., Weiner, J. H., *et alli*. (2002). Chromosomal system for studying AmpC-mediated β -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), pp. 1535-9.

- Pfeifle, D., Janas, E., Wiedemann, B. (2000). Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC β -Lactamase expression in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), pp. 169–72.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), pp. 1–11.
- Pitout, J. D., Gregson, D. B., Church, D. L., *et alli*. (2007). Population-based laboratory surveillance for AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), pp. 443-8.
- Pitout, J. D. D., Le, P. G., Moore, K. L., *et alli*. (2010). Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, pp. 165–70.
- Poirel, L., Héritier, C., Podglajen, I., *et alli*. (2003). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), pp. 755-8.
- Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp. 2200–23.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 20–51.
- Potz, N. A., Colman, M., Warner, M., *et alli*. (2004). False-positive extended-spectrum β -lactamase tests for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(3), pp. 545-7.
- Pournaras, S., Poulou, A., Voulgari, E., *et alli*. (2010). Detection of the new metallo- β -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), pp. 1604-7.
- Queenan, A. M., Jenkins, S., Bush, K. (2001). Cloning and biochemical characterization of FOX-5, an AmpC-type plasmid-encoded β -lactamase from a New York City *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), pp. 3189-94.
- Quinteira S, Peixe L. (2006). Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Applied Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3743-5.

- Quiroga, M. P., Andres, P., Petroni, P., *et alli.* (2007). Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), pp. 466–70.
- Rajni, E., Rawat, U., Malhotra, V. L., *et alli.* (2008). Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* causing UTI. *The Journal of Communicable Diseases*, 40(1), pp. 21-5.
- Raskine, L., Borrel, I., Barnaud, G., *et alli.* (2002). Novel plasmid-encoded class C β -lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), pp. 2262-5.
- Reisbig, M. D., Hanson, N. D. (2002). The ACT-1 plasmid-encoded AmpC β -lactamase is inducible: detection in a complex β -lactamase background. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (49(3), pp. 557-60.
- Reisbig, M. D., Hossain, A., Hanson, N. D. (2003). Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, pp. 1141–51.
- Roche, C., Boo, T. W., Walsh, F., *et alli.* (2008). Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(6), pp. 616-8.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Nordmann, P., Ronco, E., *et alli.* (2010). Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010 54(8), pp. 3484-8.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), pp. 4783-8.
- Roh, K. H., Uh, Y., Kim, J. S., *et alli.* (2008). First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing both SHV-12-type extended-spectrum β -lactamase and DHA-1-type AmpC β -lactamase at a Korean hospital. *Yonsei Medical Journal*, 49(1), pp. 53-7.
- Rossolini, G. M., Mantengoli, E. (2008). Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 6), pp. 2-8.

- Ruppé, E., Bidet, P., Verdet, C., *et alli.* (2006). First detection of the Ambler class C 1 AmpC β -lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), pp. 4204-7.
- Ryoo, N. H., Kim, E. C., Hong, S. G., *et alli.* (2005). Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 698–702.
- Saier, M. H. Jr. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), pp. 354-411.
- Santos, C., Caetano, T., Ferreira, S., *et alli.* (2010). Tn5090-like class 1 integron carrying *bla*(VIM-2) in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(10), pp. 1558-61.
- Schaeffer, A. J., Rajan, N., Cao, Q., *et alli.* (2001). Host pathogenesis in urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), pp. 245-51.
- Schmidtke, A. J., Hanson, N. D. (2006). Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated β -lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), pp. 2030–7.
- Seki, L. M., Pereira, P. S., de Souza, M. P., *et alli.* (2011). Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(2), pp. 274-7.
- Seo, M. R., Park, Y. S., Pai, H. (2010). Characteristics of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. *Chemotherapy*, 56(1), pp. 46-53.
- Sidjabat, H. E., Townsend, K. M., Hanson, N. D., *et alli.* (2006). Identification of *bla*(CMY-7) and associated plasmid-mediated resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs at a veterinary teaching hospital in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), pp. 840-8.
- Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Qureshi, Z. A., *et alli.* (2009). Clinical features and molecular epidemiology of CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, 48(6), pp. 739-44.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 2(5):a000414.

- Simner, P. J., Zhanel, G. G., Pitout, J., *et alli.* (2011). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69(3), pp. 326-34.
- Simões, S., Lito, L., Melo-Cristino, J., *et alli.* (2008). Plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase and CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 7), pp. S340.
- Singtohin, S., Chanawong, A., Lulitanond, A., *et alli.* (2010). CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(3), pp. 271-7.
- Sirichote, P., Hasman, H., Pulsrikarn, C., *et alli.* (2010). Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), pp. 883-8.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., *et alli.* (2008). Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp. 1238-43.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., *et alli.* (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp. 434-52.
- Song, J. S., Jang, S. J., Lee, J. J., *et alli.* (2009). Association of the *bla*_{CMY-10} gene with a novel complex class 1 integron carrying an ISCR1 element in clinical isolates from Korea. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), pp. 1013-7.
- Song, W., Kim, J. S., Kim, H. S., *et alli.* (2006). Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 55(3), pp. 219-24.
- Song, W., Kim, J. S., Kim, H. S., *et alli.* (2006a). Emergence of *Escherichia coli* isolates producing conjugative plasmid-mediated DHA-1 β -lactamase in a Korean university hospital. *The Journal of Hospital Infection*, 63(4), pp. 459-64.
- Song, W., Lee, H., Lee, K., *et alli.* (2009). CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 2), pp. 261-6.

- Song, W., Kim, J., Bae, I. K., *et alli.* (2011). Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), pp. 1414-9.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, 2ª Edição. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Suárez, C., Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), pp. 116–29.
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J., *et alli.* (2010). Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *Journal of Bacteriology*, 192(22), pp. 6045-55.
- Tan, T. Y., Ng, L. S., He, J., *et alli.* (2009). Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), pp. 146-9.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., *et alli.* (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), pp. 2233-9.
- Therrien, C., Levesque, R. C. (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), pp. 251-62.
- Thomson, K. S. (2010). Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), pp. 1019-25.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., Walsh, T. R. (2006). ISCR Elements: Novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), pp. 296–316.
- Tollentino, F. M., Polotto, M., Nogueira, M., *et alli.* (2011). High prevalence of *bla*(CTX-M) extended spectrum β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*(SHV-12), *bla*(SHV-31), *bla*(SHV-38), and *bla*(CTX-M-15) in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17(1), pp. 7-16.
- Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., *et alli.* (2009). Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), pp. 362-7.
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Mentis, A. F., *et alli.* (1993). Identification of a novel plasmid-mediated β -lactamase with chromosomal cephalosporinase

- characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31(5), pp. 645-54.
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Mentis, A. F. (1994). Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (*bla_{LAT-1}*) found in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), pp. 2207-9.
- Usha, G., Chunderika, M., Prashini, M., *et alli*. (2008). Characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella* spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(1), pp. 86-91.
- Vakulenko, S., Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), pp. 430–50.
- Valverde, A., Cantón, R., Galán, J. C., *et alli*. (2006). In117, an unusual In0-like class 1 integron containing *CR1* and *bla_{CTX-M-2}* and associated with a Tn21-like element. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), pp. 799–802.
- Valverde, A., Cantón, R., Garcillán-Barcia, M. P., *et alli*. (2009). Spread of *bla_{CTX-M-14}* is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5204–12.
- Vanwynsberghe, T., Verhamme, K., Raymaekers, M., *et alli*. (2007). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring an AmpC (DHA-1) and a *bla_{SHV-11}* in a Belgian hospital, August-December 2006. *Euro Surveill*, 12(2):E070201.3.
- Verdet, C., Benzerara, Y., Gautier, V., *et alli*. (2006). Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), pp. 607–17.
- Verdet, C., Gautier, V., Chachaty, E., *et alli*. (2009). Genetic context of plasmid-carried *bla_{CMY-2-like}* genes in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), pp. 4002-6.
- Vieira, J., Saraiva, R., Vasconcelos, L., *et alli*. (2007). Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 39(2), pp. 119-21.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., *et alli*. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), pp. 2518-29.

- Voets, G. M., Platteel, T. N., Cohen Stuart, J. W., *et alli.* (2011). Molecular survey of β -lactamases conferring third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* from the Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(Suppl. 4), pp. S145.
- Wachino, J-I., Kurokawa, H., Suzuki, S., *et alli.* (2006). Horizontal transfer of *bla*CMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), pp. 534–41.
- Wang, Q., Cheng, J., Chen, Y., *et alli.* (2008). Characterization of a novel AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in China. *Current Microbiology*, 57(6), pp. 558-63.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., *et alli.* (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), pp. 2242-8.
- Winokur, P. L., Brueggemann, A., DeSalvo, D. L., *et alli.* (2000). Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), pp. 2777-83.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., *et alli.* (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), pp. 1136-51.
- Woodford, N., Reddy, R., Fagan, E. J., *et alli.* (2007). Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (1), pp. 102–5.
- Woodford, N., Turton, J. F., Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp. 736-55.
- Wozniak, R. A., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., *et alli.* (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genetics*, (12):e1000786.
- Wu, J. J., Ko, W. C., Wu, H. M., *et alli.* (2008). Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999-2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), pp. 1234-9.

- Wu, J. J., Wang, L. R., Liu, Y. F., *et alli.* (2011). Prevalence and characteristics of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Taiwanese university hospital. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), pp. 259-66.
- Wu, L. T., Hung, S. W., Chuang, Y. C., *et alli.* (2005). Identification of a novel cephalosporinase (DHA-3) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Taiwan. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(11), pp. 893-7.
- Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., *et alli.* (2005). Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), pp. 2551-8.
- Yamada, Y., Ishii, Y., Kouyama, Y., *et alli.* (2009). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-12 and DHA-1 β -lactamases accompanied by carbapenem resistance during hospitalization in a chronic care ward in Japan. *Journal of Chemotherapy*, 21(4), pp. 445-7.
- Yamasaki, K., Komatsu, M., Abe, N., *et alli.* (2010). Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the Kinki region of Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), pp. 3267-73.
- Yan, J. J., Wu, J. J., Lee, C. C., *et alli.* (2010). Prevalence and characteristics of ertapenem-nonsusceptible *Escherichia coli* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2007. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(11), pp. 1417-25.
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., *et alli.* (2010). Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), pp. 63-72.
- Yang, H., Chen, H., Yang, Q., *et alli.* (2008). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), pp. 4268-73.
- Yang, K., Guglielmo, J. B. (2007). Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing organisms. *The Annals of Pharmacotherapy*, 41, pp. 1427-35.
- Yigit, H., Anderson, G. J., Biddle, J. W., *et alli.* (2002). Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased

- expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), pp. 3817–22.
- Yilmaz, N., Agus, N., Bozcal, E., *et alli.* (2010). Inhibitor-based methods using boronic acid compounds for detection of AmpC β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(Suppl. 3), pp. S182.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C.G., *et alli.* (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5046-54.
- Yoo, J. S., Byeon, J., Yang, J., *et alli.* (2010). High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from long-term care facilities in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), pp. 261-5.
- Yum, J. H., Kim, S., Lee, H., *et alli.* (2005). Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2 and DHA-1-type AmpC β -lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Korean Medical Science*, 20(6), pp. 961-5.
- Zioga, A., Whichard, J. M., Kotsakis, S. D., *et alli.* (2009). CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), pp. 1256-9.

VIII. ANEXOS

ANEXO I

Comunicações apresentadas em congressos internacionais

21st ECCMID / 27th (ICC), Milan.



Autor apresentador (presenting author)

Freitas, F., Silva, R., Novais, A., Coque, T., Cantón, R., Peixe, L., Machado, E. (2011). Evaluation of a confirmatory test for phenotypic detection of acquired AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(Suppl. 4), pp. S153-4.

Freitas, F., Novais, A., Gonçalves, T., Amaral, S., Cantón, R., Coque, T., Machado, E., Peixe, L. (2011). Dissemination of DHA-1 and CMY-2 beta-lactamases among *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Portuguese clinical settings. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(Suppl. 4), pp. S373.

21st ECCMID/27th ICC
Milan 2011

P- 694



Evaluation of a Confirmatory Test for Phenotypic Detection of Acquired AmpC Beta-Lactamases

Francisco Freitas^{1,2*}, Ricardo Silva¹, Ângela Novais³, Teresa M. Coque⁴, Rafael Cantón⁴, Luísa Peixe³, and Elisabete Machado^{1,3}
on behalf of The Portuguese Resistance Study Group

¹CEBIMED, Laboratório de Microbiologia, FCS, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal; ²Laboratório de Microbiologia, Hospital S. Teotónio, Viseu, Portugal; ³REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal; ⁴Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain



INTRODUCTION

✓ The acquired AmpC β -lactamases (qAmpC), mainly CMY-2 and DHA-1, are a worldwide emerging mechanism of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* lacking inducible AmpC enzymes, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* (1).

✓ Detection of qAmpC should be routinely performed at clinical laboratories, as this resistance mechanism has been associated with false cephalosporin susceptibility reports and therapeutic failures (2).

✓ Cephamycins (cefotaxim) resistance or decreased susceptibility is commonly suggestive of the presence of qAmpC producers, but have demonstrated not enough reliability when considered alone, since other resistance mechanisms could be involved (3).

✓ Some inhibitors could be used in phenotypic confirmatory tests for qAmpC detection, being boronic acid compounds the best studied (4). However, a standard recommended method has yet to be approved.

OBJECTIVES

➤ To evaluate the ability of the combination-disk test of phenylboronic acid (PBA) and cefotetan for phenotypic detection of qAmpC producers in *Enterobacteriaceae* lacking inducible AmpC, using cefotaxim resistance (≤ 14 mm) as a screening agent.

➤ To compare the accuracy of the combination-disk test with *bla*_{qAmpC} gene detection by PCR.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial Isolates

⇒ A total of 89 clinical isolates [29 *E. coli* (EC), 50 *K. pneumoniae* (KP), 9 *K. oxytoca* (KO), 1 *P. mirabilis*] resistant to cefotaxim (FOX) and intermediate/resistant to amoxicillin-clavulanic acid (AMC) and at least one oxyimino-cephalosporin (O-CEF) (5) were selected for phenotypic confirmatory tests of qAmpC production (3).

⇒ Isolates were recovered during a 7-year period (2002-08) from 3 hospitals and 2 ambulatory laboratories across Portugal and included DHA-1 (n=7), DHA-1+ ESBL (SHV-5, -12, and -90) (n=39) and CMY-2 (n=3) producers, as well as *bla*_{qAmpC}(-)/*bla*_{ESBL}(+) (n=7) and *bla*_{qAmpC}(-)/*bla*_{ESBL}(+) (n=33).

Phenotypic Confirmatory Tests for qAmpC production

⇒ The PBA disk test was performed on Mueller-Hinton agar using disks containing only cefotetan (CTT) (30 μ g) and disks with CTT plus PBA (30 μ g/400 μ g) (2). Disks with PBA were also prepared and included for control of the technique (2).

⇒ A DHA-1-producing *K. pneumoniae* clinical isolate (H427) and *E. coli* ATCC 25922 were used as positive and negative controls, respectively.

⇒ A positive test for the presence of qAmpC was considered if occurred an increase of ≥ 5 mm in the inhibition zone of the CTT/PBA disk in comparison with the CTT disk (2).

⇒ Identification of *bla*_{qAmpC} genes was carried out by PCR using primers and amplification conditions described by D'Andrea *et al.* (6) and further sequencing.

Figure 1. *Klebsiella pneumoniae* isolate with a positive PBA Test



PBA, Phenylboronic Acid; CTT, Cefotetan.

Table 1

Performance of the PBA Test in comparison with qAmpC gene detection

Test result	Species / Total	<i>bla</i> _{qAmpC} (+)	<i>bla</i> _{qAmpC} (-)
PBA (+) (n=59)	<i>K. pneumoniae</i>	41	3
	<i>K. oxytoca</i>	4	1
	<i>E. coli</i>	3	7
	Total	48	11
PBA (-) (n=30)	<i>K. pneumoniae</i>	0	6
	<i>K. oxytoca</i>	0	4
	<i>E. coli</i>	2	17
	<i>P. mirabilis</i>	0	1
Total	2	28	

RESULTS AND DISCUSSION

⇒ The PBA test was positive in 59 FOX^R isolates (44 KP, 10 EC, 5 KO) (Figure 1, Table 1). Of these, 41 DHA-1-producing KP, 4 DHA-1-producing KO and 3 CMY-2-producing EC were identified.

⇒ In the remaining 11 isolates (7 EC, 3 KP, 1 KO) the PBA test gave a false positive reaction (PCR assays for *bla*_{qAmpC} were negative). Similar results have been observed by other authors (7, 8). In EC these might be attributable to natural AmpC hyper-production, while in KP and KO decreased permeability to cefotetan by porin alterations might be involved (8).

⇒ The presence of scattered colonies located near the edge of the inhibition zone of CTT alone was frequently observed in isolates with a positive PBA test (Figure 1), supporting the findings of Mirelis *et al.* that this phenotypic trait could be useful in qAmpC detection (9).

⇒ Only 2 DHA-1-producing EC gave a false negative reaction in the PBA test, despite being FOX and AMC resistant. This has also been reported by Lee *et al.* (8), and other cephalosporin/boronic acid combinations should be attempted on these isolates.

⇒ The presence of an ESBL did not significantly affect the test performance, since all but 2 EC qAmpC+ESBL producers were not detected.

⇒ Overall the sensibility and specificity of the method for this collection of isolates were 96% and 71.8%, while the positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were 81.4% and 93.3%, respectively.

CONCLUSIONS

⇒ The PBA test combined with our screening method of qAmpC phenotypes (FOX^R-AMC^R-O-CEF^R) displayed a high sensitivity with a good NPV but only moderate specificity for detection of qAmpC producers.

⇒ We suggest that other cephalosporin/boronic acid combinations should be included in the phenotypic confirmatory tests, especially to rule out natural AmpC hyperproduction in EC.

⇒ The PBA test has a good potential to be included in the routine microbiology laboratory screening.

REFERENCES

- Jacoby, G. A. (2009). *Clin Microbiol Rev* 22(1):161-82.
- Coudron, P. E. (2005). *J Clin Microbiol* 43(8):4163-7.
- Pitout, J. D. D., *et al.* (2010). *Clin Microbiol Infect* 16:168-76.
- Dai, Y., *et al.* (2007). *Int J Infect Dis* 11:159-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *CLSI document M100-S17*, 2007.
- D'Andrea, M. M., *et al.* (2006). *Antimicrob Agents Chemother* 50(2):618-24.
- Fisher, M. A., *et al.* (2005). *J Med Microbiol* 53:774-8.
- Lee, W., *et al.* (2006). *Korean J Lab Med* 29:448-54.
- Mirelis, B., *et al.* (2006). *Emerg Infect Microbiol Clin* 24(6), pp. 370-2.

ACKNOWLEDGMENTS

Contributing members of the Portuguese Resistance Study Group are Helena Ramos, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal; Graça Ribeiro and Cláudia Vital, Hospital Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal; José Miguel Ribeiro, Hospital de São Teotónio; and Sónia Magalhães, LabPaf, Fafe, Portugal.

21st ECCMID/27th ICC
Milan 2011

P- 1343



Dissemination of DHA-1 and CMY-2 Beta-Lactamases among *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Portuguese clinical settings

Francisco Freitas^{1,2*}, Ângela Novais³, Teresa Gonçalves^{1,3}, Soraia Amaral^{1,3}, Rafael Cantón⁴,
Teresa M. Coque⁴, Elisabete Machado^{1,3}, and Luísa Peixe³ on behalf of The Portuguese Resistance Study Group

¹CEBIMED, Laboratório de Microbiologia, FCS, Universidade Fernando Pessoa, Porto; ²Laboratório de Microbiologia, Hospital S. Teotónio, Viseu;

³REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal; ⁴Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain



INTRODUCTION

✓ Acquired AmpC beta-lactamases (qAmpC) have increasingly been recognized among *Enterobacteriaceae* lacking inducible AmpC, such as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. and *P. mirabilis* (1).

✓ qAmpC confer resistance to cephamycins (cefotixin-FOX; cefotetan-CTT) and reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and β -lactamase inhibitors (2), being usually encoded on plasmids carrying multiple antibiotic resistance genes, which limits therapeutic alternatives (3).

✓ qAmpC enzymes are grouped according to the DNA sequence similarity with natural chromosomal AmpCs of some *Enterobacteriaceae* species, namely *C. freundii* (CMY-2-like, LAT-1, CFE-1), *Enterobacter* spp. (ACT-1-like, MIR-1-like), *M. morgannii* (DHA-1-like) and *H. alvei* (ACC-1-like), and with *Aeromonas* spp. (CMY-1-like, FOX-1-like, MOX-1-like) (1).

✓ Several outbreaks have been reported in the literature (mainly involving CMY-2, DHA-1 and ACC-1), with significant geographical differences in the epidemiology and prevalence of different types (2).

✓ Available studies on Portuguese qAmpC epidemiology at the molecular level are scarce and only describe the presence of particular types in specific species or the occurrence of qAmpCs in particular hospitals for short periods of time (4, 5, 6).

OBJECTIVES

To investigate the occurrence and diversity of genes coding for qAmpC enzymes among *Enterobacteriaceae* lacking inducible AmpCs from Portuguese clinical settings over a 7-year period (2002-08).

MATERIAL AND METHODS

⇒ We selected 100 presumptive qAmpC producers (34 *E. coli*, 52 *K. pneumoniae*, 13 *K. oxytoca*, and 1 *P. mirabilis*) recovered from 3 Portuguese hospitals and 2 ambulatory laboratories from the North and Centre of Portugal, during a 7-year period (2002-08).

⇒ Presumptive qAmpC producers comprised 89 FOX^R and 11 FOX^S (ACC-like enzymes do not confer resistance to cefotixin) isolates that were concurrently intermediate/resistant to amoxicillin-clavulanic acid (AMC) and to at least one oxyimino-cephalosporin (cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime) (7).

⇒ Bacterial identification and preliminary susceptibility testing were assessed using the automated system Phoenix 100[®] (Becton Dickinson). Further antimicrobial susceptibility to β -lactam and to non- β -lactam antibiotics was determined by the standard disk diffusion method following CLSI guidelines (8).

⇒ qAmpC expression was investigated by the PBA test (phenylboronic acid) for FOX^R strains (7, 9) and with the FOX-Ceftazidime/FOX-Cefotaxime double disk synergy tests for the FOX^S strains (10). ESBL expression was investigated by the DDST test (11).

⇒ Characterization of genes coding for qAmpC (*bla*_{CMY}/*MOX*/*FOX*/*LAT*/*ACT*/*MIR*/*DHA*/*MOR*/*ACC*) or ESBL (*bla*_{TEM}/*SHV*/*CTX*-M) was performed by PCR and further sequencing (12, 13).

⇒ Clonal relatedness was established by PFGE, using *Xba*I as restriction enzyme (13). *E. coli* phylogenetic groups were determined by a multiplex PCR (14) and *E. coli* clonal complexes were identified by Multilocus Sequence Typing (MLST) using the standard seven housekeeping loci (www.mlst.net).

⇒ Conjugation experiments were performed by filter mating methods using *E. coli* strain BM21R (Na^R, Rif^R) or *E. coli* HB101 (when donor strains were Rif^R, Cm^R, Str^R, Km^R, Az^R) as recipients. Transconjugants were selected on MacConkey agar plates supplemented with cefotixin (10 mg/L) and rifampin (100 mg/L or 256 mg/L), or cefotixin (10 mg/L) and azido zide (200 mg/L) (15, 16). These were attempted twice.

Table 1 - Occurrence and diversity of qAmpC-producing *Enterobacteriaceae* (2003-2008)

Species	qAmpC type	Year	Isolates per Hospital ^a	PFGE-type	Phylogenetic Group	MLST type	Associated ESBL ^b		
<i>E. coli</i>	CMY-2 (3) DHA-1 (2)	2006	HB (2)	ESA (1), ESB (1)	B1	km265 (1), ND (1)	None (2)		
		2007	HB (1)	ESC	B1	ST101	None (1)		
		2007	HB (1)	ESD	B1	ST108	SHV-type (1)		
		2008	HA (1)	NEF	B2	km224	SHV-type + CTX-M-32 (1)		
<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1 (4)	2003	HA (3)	KpB (2), KpB4 (1)		SHV-5 (1), SHV-9 (2)			
		2004	HA (12), LE (1)	KpA (1), KpB (11), KpC (1)		SHV-type (2), SHV-5 (4), SHV-12 (3), SHV-30 (6)			
		2004	HA (4), HB (1)	KpC (1), KpE (3), KpG (1)		SHV-type (4), None (1)			
		2007	HA (3), HB (7)	KpD (1), KpE (3), KpF (6)		SHV-type (4), SHV-12 (4); None (2)			
		2008	HA (8), HB (4)	KpF (4), KpG (1), KpI (2), KpJ (2), KpK (1)		SHV-type (3), SHV-12 (1); None (3), None (4)			
		<i>K. oxytoca</i>	DHA-1 (4)	2003	HA (2)	KpA (2)		SHV-12 (2)	
				2004	HA (1)	KpA1		SHV-12 (1)	
2004	HA (1)			KpB		SHV-type (1)			
2008	HA (1)			KpB		SHV-type (1)			

^aHA, Hospital Geral de Santo António, Porto; HB, Hospital de São Teotónio, Viseu; LE, Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; ND, 1607 (2847) of DHA-1-producing isolates also harboured *bla*_{CMY-2}; ND, not determined.

RESULTS

⇒ qAmpC expression was observed in 59% (59/100) of the isolates, being only detected among FOX^R isolates (66%, 59/89). Of the 59 isolates exhibiting a positive PBA test, 50 yielded a *bla*_{qAmpC} amplicon.

⇒ *bla*_{DHA-1} was the most common qAmpC variant (80%, 47/59) throughout the studied period, whereas *bla*_{CMY-2} was only detected in 5% (3/59) of the isolates (Table 1). qAmpC producers were mainly recovered from urine (38%, 19/50) or respiratory samples (26%, 13/50).

⇒ *bla*_{DHA-1} was detected among *K. pneumoniae* (n=41; 12 PFGE-types), *K. oxytoca* (n=4; 2 PFGE-types) and *E. coli* (n=2; 2 PFGE-types) isolates. An epidemic DHA-1-producing *K. pneumoniae* clone (KpF, 13 isolates) was identified in two hospitals (April 2006-June 2008). A possible outbreak of DHA-1-producing *K. pneumoniae* (KpB, n=14) and *K. oxytoca* clones (KpA, n=3) occurred in hospital A (October 2003-December 2004) (Figure 1, Table 1). *E. coli* DHA-1 producers belonged to the B1-ST1196 and the B2-*fumC24* clones.

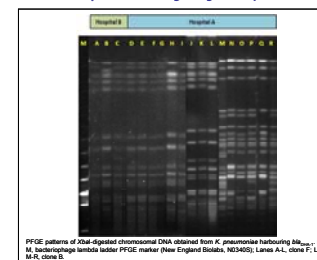
⇒ *bla*_{CMY-2} was only detected among *E. coli* isolates (n=3) showing distinct PFGE-types. All belonged to the phylogroup B1 and to different *E. coli* lineages (one of them identified as ST101).

⇒ Most qAmpC producers (82%, 41/50) also co-expressed SHV-type (mostly SHV-5 or SHV-12) and/or CTX-M-32 enzymes (CTX-M-32).

⇒ Co-resistance to non-beta-lactams was also frequently observed among qAmpC producers, mainly to kanamycin (98%), tobramycin (96%), streptomycin (84%), sulfonamides (96%), ciprofloxacin (82%), and trimethoprim (80%).

⇒ *bla*_{DHA-1} or *bla*_{CMY-2} genes were not transferred by conjugation, despite different receptors and attempts were used.

Figure 1. Most prevalent PFGE patterns of DHA-1-producing *K. pneumoniae* among Portuguese Hospitals



PFGE patterns of *Xba*I-digested chromosomal DNA obtained from *K. pneumoniae* harbouring *bla*_{DHA-1}. Lane M, bacteriophage lambda-tobacco ladder; PFGE marker (New England Biolabs, ND340); Lanes A-I, clone F; Lanes M-F, clone B.

CONCLUSIONS

⇒ Our study demonstrates the presence and potential spread of qAmpC (DHA-1, CMY-2) enzymes in Portuguese clinical settings at least since 2003, associated with different ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

⇒ Dissemination of *bla*_{DHA-1} or *bla*_{CMY-2} in Portuguese clinical institutions might have contributed to the amplification of particular *K. pneumoniae* lineages. Nevertheless, the presence of qAmpC genes in a diversity of enterobacterial clones suggests their transfer by different lateral genetic events.

⇒ The detection of different class A and class C beta-lactamases in different enterobacterial species indicates an evolution towards a more complex epidemiological situation in Portugal. More studies will be necessary to analyze the selection of these amplified clones and to characterize the mobile genetic elements involved in the successful spread of these β -lactamase genes.

REFERENCES

- Phillips, A. et al. (2002). *Antimicrob Agents Chemother* 46(1):1-11.
- Jacoby, G. A. (2009). *Clin Microbiol Rev* 22(1):161-82.
- Carattini, A. (2008). *Antimicrob Agents Chemother* 52(8):2227-38.
- Ferreira, S. et al. (2009). *Clin Microbiol Infect* 19(5):533-33.
- Simões, S. et al. (2008). *Clin Microbiol Infect* 14(3):334-40.
- Arantes, P. et al. (2010). *J Antimicrob Chemother* 65(19):2097-2100.
- Phout, J. D. et al. (2010). *Clin Microbiol Infect* 16:168-79.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *CLSI document M100-S17*, 2007.
- Coudron, P. E. (2005). *J Clin Microbiol* 43(8):1418-7.
- Ruppel, F. et al. (2005). *J Clin Microbiol* 44(1):426-7.
- Jerler, V. et al. (1998). *Rev Infect Dis* 19(4):567-75.
- D'Andrea, M. M. et al. (2006). *Antimicrob Agents Chemother* 50(2):618-24.
- Coque, T. M. et al. (2002). *Antimicrob Agents Chemother* 46:690-9.
- Clement, O. et al. (2000). *Appl Environ Microbiol* 66(10):4555-8.
- Verdet, C. et al. (2006). *Antimicrob Agents Chemother* 50(2):807-17.
- Anwar, H. et al. (2004). *Antimicrob Agents Chemother* 48(2):333-7.

ACKNOWLEDGMENTS

Contributing members of the Portuguese Resistance Study Group are Helena Ramos, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal; Graça Ribeiro and Cláudia Vais, Hospitala Universitaria de Colômbia, Colômbia, Portugal; José Miguel Ribeiro, Hospital de São Teotónio; and Sónia Magalhães, LAFde, Faro, Portugal.