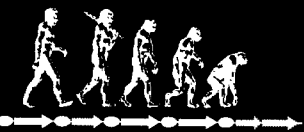




**Sandra Maria Basílio Quinteira**



# **Eco-epidemiologia de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases com impacto clínico**

**Sandra Maria Basílio Quinteira**

# **Eco-epidemiologia de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases com impacto clínico**



*Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*

Laboratório de Microbiologia  
2005

|                       |
|-----------------------|
| FACULDADE DE FARMÁCIA |
| U. P.                 |
| BIBLIOTECA            |
| Data 07/09/2006       |
| Reg. 3435             |
| Cota                  |

FFD  
QVI

*Dissertação apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto  
para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia*

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo  
Programa PRODEP Acção 5.3 - Formação Avançada de Docentes



União Europeia  
Fundo Social Europeu



*"The important thing in science is not so much to obtain new facts  
as to discover new ways of thinking about them."*

William Bragg

*"Research is what I am doing...  
when I don't know what I am doing."*

Wernher von Braun

*Para o Miguel,*

## Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Luísa Maria Sobreira Vieira Peixe, quero agradecer a orientação, o empenho, dedicação e disponibilidade sempre presentes ao longo da realização do presente trabalho, bem como os incentivos constantes, a força e a amizade que sempre me ofereceu nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa quero agradecer a oportunidade de realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e por ter despertado numa bióloga o interesse pelo fascinante tema da resistência bacteriana.

Aos Profs. Doutores Nazaré Pestana, São José Nascimento, Helena Ferreira, Eugénia Pinto, Lucília Saraiva e Miguel Cabral e a todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia agradeço a forma simpática e cordial com que me receberam e toda a ajuda e disponibilidade demonstradas ao longo destes anos.

À D. Fernandinha, D. Deolinda e D. Filomena agradeço a forma dedicada e amiga com que me acolheram.

À Dra Cristina Réu agradeço toda a colaboração prestada neste trabalho, bem como a simpatia e carinho com que sempre me tratou.

À Cristina Antão, Susana Coimbra, Maria João Neuparth, Ana Palmeira e Serafim Duarte, agradeço o incentivo, ajuda e amizade constantes.

À Alexandra Figueiredo que, apesar de já não se encontrar no laboratório, esteve presente no início desta minha caminhada e cujas risadas são lembradas com saudade.

À Carla Novais, a minha primeira companheira de bancada, cuja companhia, ajuda, amizade sincera e apoio constantes quero registar e agradecer.

À Patrícia Antunes, que um dia surgiu no laboratório a impor um ritmo a que não estávamos habituados (o que também lhe valeu o título de General Antunes!), e cuja amizade tem vindo a solidificar-se ao longo destes anos, agradeço o incentivo constante, conselhos sábios e ajuda em fases cruciais deste trabalho.

À Elisabete Machado, o elemento mais recente nestas aventuras bacterianas, quero agradecer o incentivo, ajuda e palavras amigas que, em momentos mais difíceis, foram determinantes.

À CESPU, na pessoa do Prof. Doutor Almeida Dias e Prof. Doutor Jorge Proença, agradeço a compreensão da importância da realização deste trabalho. Agradeço também o apoio financeiro do Programa PRODEP.

A todos os meus familiares e amigos, obrigada pelo permanente incentivo e preocupação.

À Prof. Doutora Maria Isaura Pinto de Sousa (Tia Isaura) e Dr. Valdemar Alves Pinto não posso deixar de manifestar profunda amizade e gratidão pelo apoio amigo, disponibilidade e ajuda constantes, bem como pela forma carinhosa com que me acolheram.

Aos meus pais, agradeço todo o carinho, amizade e compreensão que nunca falharam. Obrigada por entenderem as minhas ausências.

À Sara Sofia, cujos pontapés vieram serenar e dar mais alento às longas horas de realização do manuscrito.

Finalmente, ao meu marido Miguel, companheiro deste e de todos os meus trabalhos, por ter sempre acreditado em mim. Obrigada pela ajuda na elaboração do trabalho, tantas vezes esgotante, pelo incentivo permanente e pela presença nos bons e maus momentos. A tua ajuda foi fundamental nesta etapa da minha vida.

A todos aqueles que, algum modo, me incentivaram a continuar a caminhada iniciada e contribuíram para a concretização da presente dissertação, um muito obrigada...

## Resumo

A resistência aos carbapenemos, um grupo de antibióticos restrito à utilização hospitalar, tem, nos últimos anos, vindo a assumir grande importância, uma vez que estes constituem um dos mais eficazes agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica das doenças infecciosas por bacilos de Gram negativo. Um dos principais mecanismos de resistência é a produção de enzimas com capacidade de hidrolisar os carbapenemos. A nível hospitalar, este mecanismo assume particular importância no género *Acinetobacter* e em *Pseudomonas aeruginosa*, tendo, por esse motivo, constituído, a nível deste nicho ecológico, o alvo de pesquisa de carbapenemases. Permanece, contudo, desconhecida a origem e reservatórios das carbapenemases adquiridas com maior relevância clínica, bem como a sua associação a bactérias de nichos ecológicos extra-hospitalares. Assim, pretendeu-se, neste trabalho, fazer o estudo eco-epidemiológico de bacilos de Gram negativo resistentes aos carbapenemos, produtores de carbapenemases, de origem humana, animal e ambiental, bem como a caracterização molecular das enzimas e determinantes genéticos associados ao fenómeno de resistência. Foram estudados 704 isolados [431 isolados de origem hospitalar, 42 de humanos saudáveis, 83 de ambulatório, 82 de origem animal (56 de aves e 28 de suínos) e 66 de origem ambiental (38 de esgotos e 28 de rios)], obtidos entre 2000 e 2005 na região Norte e Centro de Portugal.

O trabalho inicial, de prospecção e caracterização de estirpes bacterianas resistentes e produtoras de enzimas com actividade sobre os carbapenemos, conduziu à descoberta da existência desse mecanismo de resistência no ambiente, indicando, claramente e de forma preocupante, um processo de disseminação. De facto, foi possível verificar a presença de dois isolados, geneticamente não relacionados, de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 em ambiente aquático, um deles obtido a partir de uma amostra de rio e o outro de um esgoto hospitalar. Algumas evidências apontam para uma disseminação com origem hospitalar deste determinante genético de resistência, e do respectivo integrão, que para além do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* alberga genes que codificam resistência para vários aminoglicosídeos comumente utilizados no tratamento das infecções por *Pseudomonas*. Salienta-se ainda que, pela primeira vez, foi encontrado o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* em *Pseudomonas*

*pseudoalcaligenes*, um isolado ambiental obtido a partir de uma amostra de um esgoto hospitalar.

O estudo dos isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenemo, num hospital universitário da cidade do Porto, permitiu constatar a endemicidade de dois clones de *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes, um deles produtor de uma carbapenemase (OXA-40), e que persistem pelo menos desde 2001. O clone produtor de OXA-40 não só se encontra amplamente disseminado neste hospital, sendo isolado de vários serviços médicos, como também noutros hospitais portugueses, em Espanha e em França, demonstrando facilidade de disseminação inter-hospitalar e entre diferentes países. Surpreendentemente, foi observada a presença da enzima OXA-40 numa espécie bacteriana onde não havia ainda sido descrita, em *Acinetobacter haemolyticus*. O comportamento de isolados de *Acinetobacter* spp. procedentes do Hospital Geral de Santo António justificou a inclusão da colistina (antibiótico recentemente reconsiderado na terapêutica de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multi-resistentes) em estudos de susceptibilidade, tendo-se demonstrado que, embora a sua utilização date apenas desde 2003, 7,2% dos isolados apresentavam já resistência.

Em *P. aeruginosa* verificou-se que a produção de carbapenemases é codificada pelo gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, dominante e amplamente disseminado na Ásia, Europa e América. A análise do seu contexto genético revelou a sua inserção em integrões de classe 1, principalmente no integrão In58. Para além da associação a este integrão, predominante em estirpes hospitalares, o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* foi ainda encontrado associado a outros integrões de classe 1 com estruturas distintas, salientando-se a descrição e caracterização, pela primeira vez, de três novos integrões de classe 1 contendo este gene, denominados In100, In102 e In103. A estrutura genética do integrão In100 despertou particular interesse, uma vez que revela um arranjo de cassetes de genes que reflecte a evolução sequencial da história do uso de antibióticos. O estudo da relação clonal entre os isolados produtores de VIM-2, determinada por PFGE, revelou heterogeneidade entre a maioria dos isolados, sendo no entanto de destacar a presença de determinados clones que parecem perdurar durante longos períodos de tempo e estar dispersos em regiões geográficas distintas. É o caso, por exemplo, da estirpe RON-1 isolada em França em 1998 (na qual é descrito pela primeira vez o integrão In58), clonalmente relacionada com um dos isolados portugueses mais antigos (1995) produtores de

VIM-2, também associada a um In58.

Finalmente, é de destacar o facto de se ter observado a presença do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* em múltiplas cópias no genoma bacteriano bem como a existência de dados, ainda que preliminares, que apontam para uma associação com um transposão do tipo *Tn5051*, elemento facilitador da sua disseminação. Relativamente à disseminação da enzima VIM-2, em Portugal, os resultados obtidos sugerem que possa ocorrer de distintas formas: disseminação clonal de isolados produtores da enzima; disseminação de integrões contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*; ou então disseminação da própria cassette que contém o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a produção de enzimas com actividade sobre os carbapenemos (carbapenemases) é um mecanismo relevante na resistência a estes agentes antimicrobianos, muitas vezes considerados únicas alternativas terapêuticas, principalmente em bacilos de Gram negativo não fermentadores. Embora em *P. aeruginosa* a disseminação clonal de estirpes produtoras de carbapenemases possa contribuir para a incidência de resistência aos carbapenemos, no caso do género *Acinetobacter*, a endemicidade de clones produtores destas enzimas parece desempenhar um papel fundamental para a elevada resistência ao imipenemo e sua persistência.

De salientar a disseminação de isolados produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2, em vários hospitais e ambiente aquático, nichos importantes como fonte e/ou reservatório de estirpes e elementos genéticos de relevância clínica.

## Abstract

Resistance to carbapenems, an antibiotic group currently restricted to hospital usage, has, during the last few years, been assuming an increasing importance since these molecules act as the most effective antimicrobial agents used in the therapeutics of Gram negative bacilli infectious diseases. One of the primary resistance mechanisms seems to be the production of carbapenem hydrolyzing enzymes. Within the clinical setting, a particular ecological niche, this mechanism assumes a major role in the resistance of the genus *Acinetobacter* and in *Pseudomonas aeruginosa* and, as such, it has become the focus of intensive carbapenemase research. However, the origin and reservoir of acquired carbapenemases with major clinical relevance remains undetermined, as well as its association with bacteria from extra-hospital niches. Thus, the main objectives of this work consisted in an eco-epidemiological study of carbapenem resistant Gram negative bacilli, producers of carbapenemases, from human, animal and environmental origin, as well as the molecular characterization of those enzymes and their resistance associated genetic determinants.

Seven hundred and four isolates were studied [431 of hospital origin, 42 from healthy humans, 83 from ambulatory, 82 from animals (56 from poultry and 26 from swine) and 66 from environmental origin (38 from sewage and 28 from rivers)], obtained between 2000 and 2005 in the northern and central region of Portugal.

Initial prospecting and characterization of resistant bacterial strains, producers of enzymes with direct activity on carbapenems, has led to the discovery of the existence of this resistance mechanism loose in the environment, clearly showing a concerning dissemination process. Indeed, it was possible to verify the presence of two VIM-2 producing, genetically unrelated, *P. aeruginosa* isolates from the aquatic environment, one recovered from a river sample and the other from an hospital sewage sample. It seems important to stress that the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene was first described in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, recovered from an environmental isolate, more specifically from an hospital sewage. Evidence points out a hospital origin dissemination process of this resistance genetic determinant, and associated integron that besides the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene also carries genes that codifies

resistance to several aminoglycosides commonly used in the treatment of *Pseudomonas* infections.

The study of imipenem resistant *Acinetobacter* isolates, in an university hospital of Porto, showed the presence of two major endemic clones of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* that persist at least since 2001, one being able to produce an OXA-40 carbapenemase. This clone not only is vastly disseminated within the hospital, being currently found in distinct wards, but is also present in other Portuguese, Spanish and French hospitals, thus highlighting the easiness in inter-hospital dissemination across different countries. Surprisingly, the presence of the OXA-40 enzyme was observed in a bacterial species where it had not previously been reported, *Acinetobacter haemolyticus*. The HGSA *Acinetobacter* spp. strains behaviour fully justified the inclusion of colistin (a recently re-introduced antibiotic in the therapeutics of multiresistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.) in the susceptibility studies, having been observed that, even though the usage dates only from 2003, 7.2% of the isolates already showed resistant phenotype.

In *P. aeruginosa*, it could be verified that carbapenemase production is coded by the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene, dominant and vastly disseminated through Asia, Europe and America. The analysis of the genetic context revealed its insertion in class 1 integrons, mainly in In58. Besides this association, predominant in hospital strains, the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene was also observed associated to other class 1 integrons with distinct structures, from which it can be highlighted the description and characterization of three new integrons, named In100, In102 and In103.

The genetic structure of In100 proved to be particularly interesting since the order of the gene cassettes reflects the sequential historic evolution of antibiotic usage. The study of the clonal relationship among VIM-2 producers, as determined by PFGE, revealed a high heterogeneity among most isolates that seem to persist through time while being dispersed over distinct geographical areas. This seems to be the case of the strain RON-1, isolated in France in 1998 (firstly described in the integron In58), clonally related with "older" Portuguese VIM-2 producing isolates (1995), and also associated with In58.

Finally, it should be highlighted the presence of the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene in multiple copies within the bacterial genome as well as the preliminary evidence that points out its association with a *Tn5051* type transposon, a genetic element that eases the dissemination process. Concerning the dissemination of the VIM-2 enzyme,

in Portugal, the obtained results suggest that it might simultaneously occur in different ways: clonal dissemination of enzyme producing isolates; *bla*<sub>VIM-2</sub> gene containing integron dissemination; or through the dissemination of the gene cassette that contains the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene.

The obtained results allow the conclusion that the production of enzymes with activity over carbapenems (carbapenemases) is a relevant resistance mechanism to these antimicrobial agents, often considered the only therapeutic alternatives, mainly in non fermentative gram negative bacilli.

Even though the clonal dissemination of carbapenemase producing *P. aeruginosa* strains might contribute to the resistance incidence, in the specific case of the genus *Acinetobacter*, the endemism of certain clone that are able to produce these enzymes seems to play a major role in the high resistance to imipenem, as well as its persistence. The dissemination of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 producing isolates, disseminated in several hospitals and in the aquatic environment, important niches that act as source and/or reservoir of strains and genetic elements of high clinical relevance, should be emphasized.

## Résumé

La résistance aux carbapénèmes, un groupe d'antibiotiques restreint à l'utilisation hospitalière, est devenue importante ces dernières années, car ceux-ci constituent un des plus efficaces agents antimicrobiens utilisés dans la thérapeutique des maladies infectieuses par des bacilles Gram négatifs. Un des principaux mécanismes de résistance est la production d'enzymes avec capacité d'hydrolyser les carbapénèmes. Au niveau hospitalier, ce mécanisme suppose particulier importance dans le genre *Acinetobacter* et dans *Pseudomonas aeruginosa*, en ayant, de ce fait, constitué, à niveau de ce niche écologique, la cible de recherche de carbapénémases. Il reste, néanmoins, inconnu l'origine et réservoirs des carbapénémases acquises avec importance clinique, ainsi que son association à des bactéries de niches écologiques extra-hospitalières. Ainsi, on a prétendu, dans ce travail, faire l'étude éco-épidémiologique de bacilles Gram négatifs résistants aux carbapénèmes producteurs de carbapénémases d'origine humaine, animale et environnementale, ainsi que la caractérisation moléculaire des enzymes et déterminants génétiques associés au phénomène de résistance. Cette étude concerne 704 isolés [431 isolé d'origine hospitalière, 42 d'origine humaine (sain), 83 clinique, 82 d'origine animale (56 de volaille et 26 de porc) et 66 d'origine environnementale (38 de égout et 28 de ravier)], obtenus entre 2000 et 2005 dans la région Nord et Centre du Portugal.

Le travail initial de prospection et de caractérisation de souches bactériennes résistants et productrices d'enzymes avec activité sur les carbapénèmes, a conduit à la découverte de l'existence de ces mêmes mécanismes de résistance dans l'environnement, en indiquant clairement et de forme préoccupant un processus de dissémination. De ce fait, il a été possible de vérifier la présence de deux isolés, génétiquement sans rapport, de *P. aeruginosa* producteurs de VIM-2 en environnement aquatique : le premier obtenu à partir d'un échantillon de fleuve et le second d'un égout hospitalier. Il faut noter qu'il a été observé pour la première fois le gène *bla<sub>VIM-2</sub>* dans *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, un isolé environnemental obtenu à partir d'un échantillon d'égout hospitalier. Quelques évidences suggèrent une dissémination avec origine hospitalière de ce déterminant génétique de résistance, ainsi que de son intégron respectif, qui outre le gène *bla<sub>VIM-2</sub>* loge des gènes

qui codifient la résistance pour plusieurs aminoglycosides communément utilisés dans le traitement des infections par *Pseudomonas*.

L'étude d'isolés de *Acinetobacter* spp. résistants à l'imipénème, dans un hôpital universitaire de la ville de Porto, a permis de constater l'endémicité de deux principaux clones de *Acinetobacter baumannii* multi-résistants, un d'eux producteur d'une carbapénémase (OXA-40), et qui persistent pour le moins depuis 2001. Ce clone se trouve disséminé dans cet hôpital, étant isolé aussi bien dans plusieurs services médicaux que dans d'autres hôpitaux portugais, en Espagne et en France, ce qui démontre la facilité de dissémination inter-hospitalier et entre de différents pays. De manière surprenante, il a été observé la présence de l'enzyme OXA-40 dans une espèce bactérienne où elle n'avait pas encore été décrit, *Acinetobacter haemolyticus*. Le comportement des isolés de *Acinetobacter* spp. originaires de HGSA a justifié l'inclusion de la colistine (antibiotique récemment reconsidérée dans la thérapeutique de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. multi-résistants) dans des études de susceptibilité, en démontrant que, bien que son utilisation date seulement de 2003, 7,2% des isolés présentait déjà une résistance.

Dans *P. aeruginosa* il s'est vérifié que la production de carbapénémases est codifiée par le gène *bla<sub>VIM-2</sub>*, dominant et suffisamment disséminé en Asie, en Europe et Amérique. L'analyse de son contexte génétique a révélé son insertion dans les intégrons de classe 1, principalement l'intégron In58. Outre l'association à cet intégron, prédominante dans des souches hospitalières, il a été observé aussi que le gène *bla<sub>VIM-2</sub>* est associé à d'autres intégrons de classe 1 possédant des structures distinctes. Ce travail a ainsi amené à la description et à la caractérisation de trois nouveaux intégrons de classe 1 contenant ce gène, appelés In100, In102 et In103. La structure génétique de l'intégron In100 a éveillé un intérêt particulier, car il révèle une disposition de cassettes de gènes qui reflète l'évolution séquentielle de l'histoire de l'utilisation d'antibiotiques. L'étude de la relation clonale entre les isolés producteurs de VIM-2, déterminée par PFGE, a révélé l'hétérogénéité de la majorité des isolés, bien qu'il faille signaler la présence de certains clones qui semblent durer de longues périodes de temps et être dispersés dans des régions géographiques distinctes. C'est le cas, par exemple, de la souche RON-1 isolée en France en 1998 (dans laquelle est décrite pour la première fois l'intégron In58), similaire génétiquement à un des isolés portugais les plus

anciens (1995) producteurs de VIM-2, lui aussi associé à un *In58*.

Finalement, il faut souligner que nous avons observé la présence du gène *bla<sub>VIM-2</sub>* dans de multiples copies dans le génome bactérien et des données, encore préliminaires, qui indiquent une association avec un transposon de type *Tn5051*, élément facilitateur de sa dissémination. À l'égard de la dissémination de l'enzyme VIM-2, au Portugal, les résultats obtenus suggèrent qu'il puisse se produire de différentes façons : dissémination clonale d'isolés producteurs de l'enzyme ; dissémination d'intégrons contenant le gène *bla<sub>VIM-2</sub>* ; ou bien encore dissémination de la cassette même contenant le gène *bla<sub>VIM-2</sub>*.

Les résultats obtenus ont permis de conclure que la production d'enzymes ayant une activité sur les carbapénèmes (carbapénémases) est un facteur important dans la résistance à ces agents antimicrobiens, bien souvent considérés comme étant les seules alternatives thérapeutiques, principalement à des bacilles Gram négatifs non fermentant.

Bien que dans *P. aeruginosa* la dissémination clonale de souches productrices de carbapénémases puisse contribuer à l'incidence de résistance aux carbapénèmes, dans le cas du genre *Acinetobacter*, l'endémicité de clones producteurs de ces enzymes semble jouer un rôle fondamental dans la résistance à l'imipénème et à sa persistance.

De faire ressortir la dissémination d'isolés producteurs de métallob-lactamase VIM-2, disséminée dans plusieurs hôpitaux et environnement aquatique, niches importants comme source et/ou réservoir de souches et d'éléments génétiques d'importance clinique.



# Conteúdo

|          |                                                                                                                                 |          |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução geral</b>                                                                                                         | <b>1</b> |
| 1.1      | Os antibióticos e o controlo das doenças infecciosas . . . . .                                                                  | 1        |
| 1.2      | Importância clínica dos carbapenemos . . . . .                                                                                  | 4        |
| 1.3      | Resistência bacteriana aos carbapenemos em bacilos de Gram-negativo . . . . .                                                   | 5        |
| 1.3.1    | Epidemiologia de <i>Acinetobacter</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes aos carbapenemos em meio hospitalar . . . . . | 6        |
| 1.3.1.1  | Importância clínica do género <i>Acinetobacter</i> . . . . .                                                                    | 8        |
| 1.3.1.2  | Importância clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .                                                                  | 9        |
| 1.4      | Carbapenemases: classificação, estrutura, mecanismos de acção e origem epidemiológica . . . . .                                 | 10       |
| 1.4.1    | Carbapenemases da classe A (grupo 2f da classificação de Bush) . . . . .                                                        | 11       |
| 1.4.2    | Metallo-enzimas da classe B (grupo 3 da classificação de Bush) . . . . .                                                        | 13       |
| 1.4.2.1  | Classificação das MBLs . . . . .                                                                                                | 14       |
| 1.4.3    | Enzimas da classe C (grupo 1 da classificação de Bush) . . . . .                                                                | 26       |
| 1.4.4    | Enzimas da classe D (grupo 2d da classificação de Bush) . . . . .                                                               | 26       |
| 1.5      | Origem e disseminação das metallo- $\beta$ -lactamases: unidades de captura genética . . . . .                                  | 28       |
| 1.6      | Objectivos . . . . .                                                                                                            | 32       |
| 1.7      | Lista de trabalhos que integram a tese . . . . .                                                                                | 33       |

|          |                                                                                                                                                                                                                           |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2</b> | <b>Epidemiologia de bacilos de Gram negativo, de origem não hospitalar, produtores de carbapenemases</b>                                                                                                                  | <b>35</b> |
| 2.1      | First isolation of <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> . . . . .                                                                                              | 36        |
| 2.1.1    | Acknowledgements . . . . .                                                                                                                                                                                                | 38        |
| 2.1.2    | References . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 38        |
| 2.2      | A multi-niche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-2, in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? . . . . .                    | 41        |
| 2.2.1    | Abstract . . . . .                                                                                                                                                                                                        | 41        |
| 2.2.2    | Note . . . . .                                                                                                                                                                                                            | 41        |
| 2.2.3    | Acknowledgments . . . . .                                                                                                                                                                                                 | 47        |
| 2.2.4    | References . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 47        |
| <b>3</b> | <b>Epidemiologia de <i>Acinetobacter</i> spp., de origem hospitalar, resistentes aos carbapenemos. Detecção e caracterização de carbapenemases. Pesquisa de unidades de captura genética associadas e sua localização</b> | <b>51</b> |
| 3.1      | Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing <i>Acinetobacter baumannii</i> clone in the Iberian Peninsula . . . . .                                                                                      | 52        |
| 3.1.1    | Synopsis . . . . .                                                                                                                                                                                                        | 52        |
| 3.1.2    | Introduction . . . . .                                                                                                                                                                                                    | 53        |
| 3.1.3    | Materials and methods . . . . .                                                                                                                                                                                           | 53        |
| 3.1.3.1  | Bacterial isolates . . . . .                                                                                                                                                                                              | 53        |
| 3.1.3.2  | Bacterial identification and susceptibility tests . . . . .                                                                                                                                                               | 54        |
| 3.1.3.3  | Pulsed-field gel electrophoresis . . . . .                                                                                                                                                                                | 55        |
| 3.1.3.4  | Determination of carbapenemase activity . . . . .                                                                                                                                                                         | 55        |
| 3.1.3.5  | PCR amplification, cloning and sequencing of <i>bla</i> <sub>OXA</sub> gene . . . . .                                                                                                                                     | 55        |
| 3.1.4    | Results . . . . .                                                                                                                                                                                                         | 56        |
| 3.1.4.1  | Bacterial identification and susceptibility tests . . . . .                                                                                                                                                               | 56        |
| 3.1.4.2  | DNA fingerprinting . . . . .                                                                                                                                                                                              | 56        |
| 3.1.4.3  | Carbapenemase activity . . . . .                                                                                                                                                                                          | 56        |
| 3.1.4.4  | Nucleotide sequence of <i>bla</i> <sub>OXA</sub> gene . . . . .                                                                                                                                                           | 57        |
| 3.1.5    | Discussion . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 57        |

|         |                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.6   | Acknowledgements . . . . .                                                                                                                                                                                            | 60 |
| 3.1.7   | References . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 60 |
| 3.2     | Clonal diversity and carbapenemase production in carbapenem-resistant <i>Acinetobacter</i> spp. isolated in a Portuguese hospital, during a four year period . . . . .                                                | 62 |
| 3.2.1   | Synopsis . . . . .                                                                                                                                                                                                    | 62 |
| 3.2.2   | Introduction . . . . .                                                                                                                                                                                                | 63 |
| 3.2.3   | Materials and methods . . . . .                                                                                                                                                                                       | 64 |
| 3.2.3.1 | Bacterial strains . . . . .                                                                                                                                                                                           | 64 |
| 3.2.3.2 | Susceptibility tests . . . . .                                                                                                                                                                                        | 65 |
| 3.2.3.3 | Determination of carbapenemase activity . . . . .                                                                                                                                                                     | 65 |
| 3.2.3.4 | PCR amplification and sequencing . . . . .                                                                                                                                                                            | 65 |
| 3.2.3.5 | Chromosomal DNA analysis by PFGE . . . . .                                                                                                                                                                            | 65 |
| 3.2.3.6 | Genetic location of <i>bla</i> <sub>OXA-40</sub> and hybridization experiments . . . . .                                                                                                                              | 66 |
| 3.2.3.7 | Statistical analysis . . . . .                                                                                                                                                                                        | 66 |
| 3.2.4   | Results . . . . .                                                                                                                                                                                                     | 66 |
| 3.2.4.1 | Susceptibility tests and PFGE typing . . . . .                                                                                                                                                                        | 66 |
| 3.2.4.2 | PCR analysis . . . . .                                                                                                                                                                                                | 69 |
| 3.2.4.3 | Genetic location of <i>bla</i> <sub>OXA-40</sub> in <i>A. baumannii</i> . . . . .                                                                                                                                     | 70 |
| 3.2.5   | Discussion . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 71 |
| 3.2.6   | Acknowledgements . . . . .                                                                                                                                                                                            | 73 |
| 3.2.7   | References . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 73 |
| 4       | <b>Epidemiologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, de origem hospitalar, produtoras de carbapenemases. Caracterização das carbapenemases, das unidades de captura genética associadas e sua localização</b> . . . . . | 79 |
| 4.1     | Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .                                                                 | 80 |
| 4.1.1   | Abstract . . . . .                                                                                                                                                                                                    | 80 |
| 4.1.2   | Note . . . . .                                                                                                                                                                                                        | 80 |
| 4.1.3   | Acknowledgements . . . . .                                                                                                                                                                                            | 84 |
| 4.1.4   | References . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 84 |

|         |                                                                                                                                  |     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2     | Multi-layered dissemination processes of <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical isolates . . . . . | 89  |
| 4.2.1   | Abstract . . . . .                                                                                                               | 89  |
| 4.2.2   | Introduction . . . . .                                                                                                           | 89  |
| 4.2.3   | Materials and Methods . . . . .                                                                                                  | 91  |
| 4.2.3.1 | Bacterial strains . . . . .                                                                                                      | 91  |
| 4.2.3.2 | Antimicrobial agents and susceptibility testing . . . . .                                                                        | 91  |
| 4.2.3.3 | Screening of MBL-producing isolates . . . . .                                                                                    | 94  |
| 4.2.3.4 | Screening of MBL genes . . . . .                                                                                                 | 94  |
| 4.2.3.5 | Screening for integrons and sequencing . . . . .                                                                                 | 94  |
| 4.2.3.6 | Plasmid DNA content analysis and conjugation assays . . . . .                                                                    | 94  |
| 4.2.3.7 | Southern and I-CeuI techniques . . . . .                                                                                         | 95  |
| 4.2.3.8 | Chromosomal DNA analysis by PFGE . . . . .                                                                                       | 95  |
| 4.2.3.9 | Nucleotide sequence accession numbers . . . . .                                                                                  | 96  |
| 4.2.4   | Results . . . . .                                                                                                                | 96  |
| 4.2.4.1 | Characteristics of the VIM-2-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates . . . . .                                                   | 96  |
| 4.2.4.2 | Clonal diversity of <i>P. aeruginosa</i> isolates . . . . .                                                                      | 96  |
| 4.2.4.3 | Structure of the <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> -containing integrons . . . . .                                                      | 97  |
| 4.2.4.4 | Genetic support of <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> and class 1 integrons . . . . .                                                    | 99  |
| 4.2.5   | Discussion . . . . .                                                                                                             | 102 |
| 4.2.5.1 | Clonal dissemination . . . . .                                                                                                   | 102 |
| 4.2.5.2 | Integron dissemination . . . . .                                                                                                 | 103 |
| 4.2.5.3 | <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> gene cassette dissemination . . . . .                                                                 | 103 |
| 4.2.6   | Acknowledgments . . . . .                                                                                                        | 105 |
| 4.2.7   | References . . . . .                                                                                                             | 105 |
| 4.3     | Contexto genético do gene <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> (resultados preliminares) . . . . .                                         | 112 |
| 4.4     | Outros resultados não incluídos em publicações . . . . .                                                                         | 112 |
| 5       | Discussão Geral . . . . .                                                                                                        | 115 |
| 6       | Apêndices . . . . .                                                                                                              | 123 |

|          |                                                                                                           |            |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>A</b> | <b>Material e Métodos</b>                                                                                 | <b>123</b> |
| A.1      | Amostragem e origem das amostras . . . . .                                                                | 123        |
| A.1.1    | Nichos ecológicos . . . . .                                                                               | 123        |
| A.1.1.1  | Amostras de humanos . . . . .                                                                             | 123        |
| A.1.1.2  | Amostras de animais . . . . .                                                                             | 125        |
| A.1.1.3  | Amostras ambientais . . . . .                                                                             | 125        |
| A.2      | Isolamento e identificação das estirpes . . . . .                                                         | 126        |
| A.2.1    | Isolados humanos . . . . .                                                                                | 126        |
| A.2.1.1  | Isolados hospitalares . . . . .                                                                           | 126        |
| A.2.1.2  | Isolados de ambulatório . . . . .                                                                         | 126        |
| A.2.1.3  | Isolados de fezes de humanos saudáveis . . . . .                                                          | 127        |
| A.2.2    | Isolados de animais . . . . .                                                                             | 127        |
| A.2.2.1  | Isolados de aves . . . . .                                                                                | 127        |
| A.2.2.2  | Isolados de suínos . . . . .                                                                              | 127        |
| A.2.3    | Isolados ambientais . . . . .                                                                             | 128        |
| A.2.3.1  | Isolados de Águas Residuais Hospitalares . . . . .                                                        | 128        |
| A.2.3.2  | Isolados de águas de rios . . . . .                                                                       | 128        |
| A.2.4    | Estirpes de colecção e estirpes controlo . . . . .                                                        | 128        |
| A.3      | Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos . . . . .                                         | 128        |
| A.3.1    | Método de difusão em agar com discos . . . . .                                                            | 128        |
| A.3.2    | Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) . . . . .                                            | 130        |
| A.3.2.1  | Método de diluição em agar . . . . .                                                                      | 130        |
| A.3.2.2  | Método de difusão em agar com tiras ("E-test") . . . . .                                                  | 130        |
| A.3.3    | Estudo dos mecanismos, estrutura e suporte genético da<br>resistência aos antibióticos . . . . .          | 131        |
| A.3.4    | Caracterização das $\beta$ -lactamases . . . . .                                                          | 131        |
| A.3.4.1  | Preparação dos extractos enzimáticos . . . . .                                                            | 131        |
| A.3.4.2  | Deteção de actividade $\beta$ -lactamásica nos ex-<br>tractos enzimáticos (teste do nitrocefin) . . . . . | 131        |
| A.3.4.3  | Determinação do ponto isoelectrico das $\beta$ -<br>lactamases . . . . .                                  | 132        |
| A.3.5    | Deteção de carbapenemases . . . . .                                                                       | 132        |
| A.3.5.1  | Preparação de extractos brutos . . . . .                                                                  | 132        |
| A.3.5.2  | Bioensaio . . . . .                                                                                       | 132        |

|         |                                                                                                                                  |     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A.3.6   | Transferência da resistência . . . . .                                                                                           | 133 |
| A.3.6.1 | Transferência da resistência ao imipenemo por<br>conjugação . . . . .                                                            | 133 |
| A.3.6.2 | Extracção de DNA plasmídico . . . . .                                                                                            | 134 |
| A.3.6.3 | Electroforese em gel de agarose . . . . .                                                                                        | 135 |
| A.3.7   | Condições gerais das reacções de amplificação de DNA<br>por PCR . . . . .                                                        | 136 |
| A.3.7.1 | Obtenção de DNA total . . . . .                                                                                                  | 136 |
| A.3.7.2 | Condições de amplificação . . . . .                                                                                              | 136 |
| A.3.7.3 | Caracterização dos produtos de amplificação<br>por electroforese . . . . .                                                       | 136 |
| A.3.7.4 | Pesquisa de genes de resistência ao imipenemo .                                                                                  | 137 |
| A.3.7.5 | Pesquisa de integrões de classe 1 . . . . .                                                                                      | 137 |
| A.3.8   | Hibridação de sondas de DNA . . . . .                                                                                            | 137 |
| A.3.8.1 | Preparação das sondas . . . . .                                                                                                  | 137 |
| A.3.8.2 | Marcação das sondas . . . . .                                                                                                    | 138 |
| A.3.8.3 | Hibridação por <i>Dot blot</i> . . . . .                                                                                         | 138 |
| A.3.9   | Pesquisa da localização genética dos genes <i>bla<sub>IM-2</sub></i> e<br><i>bla<sub>OXA</sub></i> (Técnica da I-CeuI) . . . . . | 138 |
| A.3.9.1 | Hibridação de fragmentos digeridos com a en-<br>zima I-CeuI . . . . .                                                            | 138 |
| A.3.9.2 | Hibridação de fragmentos digeridos com a en-<br>zima BamHI . . . . .                                                             | 139 |
| A.4     | Estudo da relação clonal entre os isolados resistentes ao imipenemo                                                              | 141 |
| A.4.1   | Genotipagem por PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )                                                                 | 141 |
| A.4.1.1 | Preparação do DNA para PFGE . . . . .                                                                                            | 141 |
| A.4.1.2 | Preparação dos <i>plugs</i> a partir de culturas em<br>meio sólido . . . . .                                                     | 141 |
| A.4.1.3 | Lise celular nos <i>plugs</i> de agarose . . . . .                                                                               | 142 |
| A.4.1.4 | Digestão com enzimas de restrição do DNA<br>contido nos <i>plugs</i> de agarose . . . . .                                        | 142 |
| A.4.1.5 | Separação dos fragmentos de DNA por PFGE .                                                                                       | 142 |
| A.4.1.6 | Visualização e interpretação do perfil electro-<br>fóretico obtido por PFGE . . . . .                                            | 143 |

|          |                                                                                                             |            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| A.5      | Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR e sequenciação . . . .                                              | 144        |
| A.5.1    | Purificação dos produtos de amplificação . . . . .                                                          | 144        |
| A.5.2    | Ligação dos produtos de amplificação ao vector de clonagem                                                  | 144        |
| A.5.3    | Transformação dos plasmídeos recombinantes . . . . .                                                        | 144        |
| A.5.4    | Seleção dos transformantes . . . . .                                                                        | 145        |
| A.5.5    | Extracção e análise de restrição de plasmídeos recombi-<br>nantes . . . . .                                 | 145        |
| A.6      | Sequenciação do DNA e análise de sequências . . . . .                                                       | 146        |
| A.7      | Caracterização das regiões adjacentes aos integrons contendo o<br>gene <i>bla<sub>IMI-2</sub></i> . . . . . | 146        |
| <b>B</b> | <b>Sequências submetidas ao Genbank</b>                                                                     | <b>151</b> |
| B.1      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> class 1 integron In100 . . . . .                                              | 151        |
| B.2      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> class 1 integron In102 . . . . .                                              | 156        |
| B.3      | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> class 1 integron . . . . .                                             | 160        |
| B.4      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> class 1 integron In103 . . . . .                                              | 163        |
| <b>7</b> | <b>Bibliografia Geral</b>                                                                                   | <b>167</b> |



# Lista de Figuras

|     |                                                                                                                              |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1 | PFGE patterns of <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> -positive <i>P. aeruginosa</i> isolates . . . .                                 | 45  |
| 3.1 | PFGE of genomic DNA from representative <i>A. baumannii</i> isolates                                                         | 58  |
| 3.2 | PFGE patterns of representative <i>Acinetobacter</i> spp. isolates . . . .                                                   | 70  |
| 4.1 | Schematic representation of the <i>P. aeruginosa</i> FF-PS2 class 1 integron, In100 . . . . .                                | 83  |
| 4.2 | PFGE patterns of SpeI-digested genomic DNA, of <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> -positive <i>P. aeruginosa</i> isolates . . . . . | 98  |
| 4.3 | Schematic representation of the <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> -carrying class 1 integrons                                      | 100 |
| 4.4 | Localization of <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> in I-CeuI-generated fragments of two <i>P. aeruginosa</i> . . . . .              | 101 |
| 5.1 | Estrutura do integrão In100, reflectindo a história da antibioterapia                                                        | 118 |



# Lista de Tabelas

|     |                                                                                                                              |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1 | Metalo- $\beta$ -lactamases cromossômicas . . . . .                                                                          | 16  |
| 1.2 | Metalo- $\beta$ -lactamases do tipo IMP . . . . .                                                                            | 18  |
| 1.3 | Metalo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM . . . . .                                                                            | 21  |
| 3.1 | Clinical data of imipenem resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> . . . .                                                   | 67  |
| 4.1 | Characteristics of the <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> -producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates . . . . .                | 92  |
| 4.2 | Characteristics of the <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> -producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates (continued...) . . . . . | 93  |
| A.1 | Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho . . . . .                                                        | 129 |
| A.2 | Descrição dos primers, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado . . . . .                          | 140 |
| A.3 | Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação . . . . .                                 | 149 |
| A.4 | Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação . . . . .                                 | 150 |

# Capítulo 1

## Introdução geral

### 1.1 Os antibióticos e o controlo das doenças infecciosas

Os agentes antimicrobianos representaram um dos maiores progressos científicos do século XX. A sua introdução, iniciada nos anos 40 com a descoberta da importância clínica da penicilina, veio marcar um ponto de viragem, possibilitando o controlo e tratamento de inúmeras infeções, até então muitas vezes fatais (Smith & Lewin, 1993; Yao & Moellering, 2003; Mascaretti, 2003), com a consequente diminuição da gravidade e letalidade associadas (Cohen, 1994). Rapidamente se verificou, no entanto, que as bactérias prontamente respondiam à acção destes primeiros compostos terapêuticos.

Ainda em 1940 foi descoberta uma enzima capaz de destruir a penicilina, numa estirpe de *Escherichia coli*, o que constituiria uma primeira indicação da vaga de resistências bacterianas que se aproximava (Mascaretti, 2003). Desde então, a emergência e disseminação da resistência bacteriana face à acção dos agentes antibacterianos tem constituído certamente um dos fenómenos mais preocupantes a nível de saúde pública, com repercussões que claramente extravasam o domínio social, nomeadamente inegáveis consequências a nível económico. A utilização inapropriada dos antibióticos é muitas vezes identificada como um importante propulsor e exponenciador dos elevados custos dos tratamentos, surgimento de efeitos secundários, falhas no tratamento e desenvolvimento de novos

## 1.1. OS ANTIBIÓTICOS E O CONTROLO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS

---

mecanismos de resistências antimicrobianas (Finch, 1998).

Numa fase inicial, a problemática das novas resistências foi contornada recorrendo essencialmente à descoberta de novas classes de antibióticos ou à modificação química de compostos previamente existentes. Contudo, ao longo dos anos, tem sido possível verificar que as bactérias apresentam distintas formas de escapar à acção dos diversos grupos de antimicrobianos, nomeadamente em ambiente hospitalar, mas também na comunidade, com o consequente aumento da morbilidade e mortalidade associadas às diversas infecções.

Nos últimos anos, essencialmente durante a última década, a resistência bacteriana aos antibióticos tem evoluído de forma dramática, sobretudo como resultado de uma utilização abusiva e inapropriada de agentes antibacterianos de largo espectro de acção. Um aumento demográfico de determinadas classes etárias, nomeadamente idosos e crianças, grupos particularmente susceptíveis às doenças infecciosas, bem como de indivíduos com SIDA, cancro, ou outras condições conducentes a estados de imunossupressão, encontram-se entre alguns dos principais factores que convertem o problema da resistência bacteriana numa realidade cada vez mais preocupante (Cassell, 1995).

A monitorização da evolução das resistências deverá ser prioritária, incluindo, como pontos fundamentais, a pesquisa dos factores de risco para a sua disseminação bem como um conhecimento concreto da propagação de estirpes resistentes em diferentes nichos ecológicos<sup>1</sup>. Actualmente, um dos nichos ecológicos mais importantes, promotor do aparecimento de elevados níveis de resistências é, indubitavelmente, o ambiente hospitalar (Kayser, 1993; Levy, 1998a). Aí, resultado da aglomeração física de um elevado número de pacientes com infecções num espaço limitado, bem como da utilização frequente de agentes antimicrobianos durante o processo terapêutico, surgem, a um ritmo crescente, estirpes bacterianas com elevados, e por vezes novos, níveis de resistência, fruto de mecanismos próprios de adaptação a um ambiente altamente selectivo e hostil (Ledeborg, 1997), num claro processo de selecção natural (ver Darwin, 1859).

Em vários géneros bacterianos, isolados de infecções nosocomiais, a in-

---

<sup>1</sup>A noção de nicho é aqui utilizada na sua vertente ecológica, podendo ser definida como um conjunto multidimensional de condições bióticas e abióticas requeridas por (ou exercidas sobre) um organismo, que condicionam a sua sobrevivência.

cidência de estirpes com resistência a múltiplos antibióticos compromete com frequência a eficácia da terapêutica instituída (Dudley, 1995). Ainda que com menor incidência, bactérias resistentes têm sido também isoladas a partir de ambientes aparentemente não sujeitos a uma pressão selectiva por agentes antimicrobianos, como plantas (Talbot *et al.*, 1980) e água de consumo (Armstrong *et al.*, 1981). A crescente utilização de agentes antimicrobianos em explorações animais, juntamente com a prática corrente de descargas de esgotos sem tratamento prévio, têm sido relacionadas com o aumento significativo do número de bactérias, em ambiente aquático, resistentes aos agentes antimicrobianos (Young, 1993).

A utilização de antibióticos no homem é, normalmente, resultado de uma prescrição com finalidade terapêutica e/ou profiláctica. No entanto, o homem pode também estar exposto, ainda que de forma indirecta, a antibióticos utilizados em criação de animais, facto que tem merecido especial atenção, principalmente no que respeita à aplicação dos antibióticos como promotores de crescimento (Levy, 1998b; Feinman, 1998).

A utilização global, incontrolada e inapropriada, de antibióticos na medicina, na agricultura e na veterinária tem contribuído para o aumento do número de bactérias com resistências a esses agentes antimicrobianos (Kümmerer, 2004). Do mesmo modo, a aplicação subterapêutica de antibióticos, na alimentação animal, como promotores de crescimento, conduz à proliferação de genes de resistência a agentes antimicrobianos, acarretando implicações directas a nível de saúde humana e animal (Feinman, 1998; Moellering, 1998). Embora necessária, a utilização terapêutica dos antibióticos em animais pode conduzir à selecção de estirpes resistentes, especialmente se este processo não seguir a mesma racionalidade exigida no caso da terapia humana (Levy, 1998b). O uso de antibióticos como promotores de crescimento, bem como a sua utilização terapêutica, encorajam fortemente a selecção de estirpes resistentes, especialmente quando os agentes antimicrobianos são fornecidos nos alimentos ou na água. Neste caso, as estirpes podem permanecer activas e sofrer larga dispersão geográfica. Um caso particular, mas simultaneamente interessante, prende-se com a utilização de antibióticos em aquaculturas. Neste caso, os fármacos permanecem no ambiente podendo sair dos tanques e atingir os sistemas aquáticos, tornando-se contaminantes ambientais disseminados. Ainda que carecendo de uma comprovação mais cabal, existem indícios de que a utilização veterinária da avoparcina, em certa áreas da

## 1.2. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS CARBAPENEMOS

---

Europa, contribuiu para a pressão que conduziu ao aparecimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Corpet, 1998). Do mesmo modo, a utilização de agentes antimicrobianos em aquacultura parece estar associada à emergência de resistências em vários organismos Gram-negativos.

### 1.2 Importância clínica dos carbapenemos

Os carbapenemos (imipenemo, meropenemo e ertapenemo) representam uma classe singular de  $\beta$ -lactâmicos<sup>2</sup> pois apresentam o maior espectro de actividade antibacteriana de todos os antibióticos correntemente disponíveis (Yao & Moellerling, 2003). Esta actividade parece ser o resultado da acção conjunta de vários factores, nomeadamente boa penetração através da membrana exterior das bactérias de Gram-negativo (envolvendo o canal de porina OprD), elevada estabilidade face à hidrólise pela maioria das  $\beta$ -lactamases e uma forte ligação aos PBPs (Mascaretti, 2003).

Para além do imipenemo e do meropenemo, recentemente, um outro carbapenemo, o ertapenemo, foi introduzido na prática clínica (Livermore *et al.*, 2003). Partilha do mesmo largo espectro de actividade do imipenemo e do meropenemo contra *Enterobacteriaceae*, espécies de Gram positivo e anaeróbios. No entanto, apresenta actividade limitada contra não-fermentadores, como é o caso de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (Livermore *et al.*, 2005). Uma grande vantagem deste antibiótico prende-se com o facto de possuir uma excelente actividade contra bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (*extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*) e/ou  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC (Livermore *et al.*, 2003).

Devido à sua estabilidade face às  $\beta$ -lactamases, os carbapenemos têm sido um

---

<sup>2</sup>Todos os elementos do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos) apresentam em comum um anel  $\beta$ -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio, com radicais substituintes (Sousa *et al.*, 1998). O anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas. Nos antibióticos monobactâmicos mantém-se apenas o anel  $\beta$ -lactâmico e, nos carbapenemos, observa-se a presença de carbono, em substituição de enxofre, no anel tiazolidina (Dever & Dermody, 1991). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ligam-se às PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*) por covalência, impedindo a síntese do peptidoglicano, com subsequente lise celular (Rolinson, 1998).

grupo de antibióticos geralmente reservados para o tratamento de doentes com infecções graves ou tratamento de infecções causadas por organismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis, incluindo os "agentes de terceira e quarta geração" (Jones *et al.*, 2005b). O aparecimento de enzimas capazes de hidrolisar os carbapenemos, muitas vezes utilizados como último recurso, não só implica a utilização de agentes alternativos potencialmente mais tóxicos (como é o caso dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e, mais recentemente, as polimixinas) como contribui para o insucesso terapêutico das infecções por bacilos de Gram-negativo, quer a nível hospitalar quer a nível da comunidade.

### 1.3 Resistência bacteriana aos carbapenemos em bacilos de Gram-negativo

A resistência aos carbapenemos tem, nos últimos anos, vindo a assumir grande importância, principalmente porque estes constituem um dos mais eficazes agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica das doenças infecciosas por bacilos de Gram-negativo. Embora os carbapenemos tenham permanecido relativamente estáveis face às  $\beta$ -lactamases clínicas mais relevantes, um número crescente de enzimas com actividade hidrolítica sobre estes agentes têm sido descritas, inicialmente com maior frequência no Japão, onde a sua utilização é intensiva (Minami *et al.*, 1996; Senda *et al.*, 1996b), mas actualmente um pouco por todo o mundo.

Em Portugal, os carbapenemos estão apenas disponíveis para utilização clínica hospitalar e considerava-se que o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes durante a terapia, com a excepção de *P. aeruginosa*, era pouco frequente. Com efeito, embora alguns microrganismos, nomeadamente *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* e *Stenotrophomonas maltophilia*, produzam naturalmente uma carbapenemase, a maioria dos bacilos Gram negativos, implicados em infecções humanas não possui mecanismos naturais que inviabilizem a actividade dos carbapenemos. Recentemente, e em resultado do uso intensivo destes agentes antimicrobianos, tem sido possível verificar um incremento de isolados resistentes, com especial predominância em *P. aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2003; Obritsch *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Dados nacionais referentes a laboratórios hospitalares indicam uma incidência de resistência de 18,7% aos carbapenemos,

### 1.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS CARBAPENEMOS EM BACILOS DE GRAM-NEGATIVO

---

nesta espécie (Cristino *et al.*, 1996). Embora a deficiência na produção de OprD seja o mecanismo mais frequentemente associado à reduzida susceptibilidade ao imipenemo, a contribuição da hiperprodução de  $\beta$ -lactamases cromossômicas e do sistema de efluxo MexAB-OprM tem sido também implicada na resistência aos carbapenemos em isolados de *P. aeruginosa* (Gotoh *et al.*, 1998, 1995; Livermore, 2001). Para além destes mecanismos de resistência assistiu-se, recentemente, ao aparecimento, nesta espécie, e em outros bacilos Gram negativos, de enzimas com elevada actividade hidrolítica sobre os carbapenemos e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Osano *et al.*, 1994; Senda *et al.*, 1996a,b). Embora seja reconhecida pelos profissionais de saúde a endemicidade hospitalar de algumas bactérias multi-resistentes, com o consequente aumento de mortalidade associada, muitas vezes a opinião pública é confrontada com esta realidade depois de alguns doentes sucumbirem a infecções por patogénicos supostamente adquiridos em ambiente hospitalar.

#### 1.3.1 Epidemiologia de *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenemos em meio hospitalar

A resistência aos carbapenemos constitui um problema clínico extremamente relevante, uma vez que estes agentes representam, em muitas situações, o último recurso no tratamento das infecções graves causadas por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, importantes patogénicos nosocomiais, notáveis pela sua capacidade de multi-resistência aos agentes antimicrobianos (Lee *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003). A elevada resistência observada nestes agentes patogénicos é um fenómeno extremamente preocupante que limita de uma forma drástica as opções terapêuticas. No que respeita à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, estas espécies expressam cefalosporinases, possuem eficientes bombas de efluxo e apresentam baixa permeabilidade da membrana exterior a muitas moléculas, podendo, desta forma, ser facilmente observada multi-resistência aos agentes antimicrobianos como resultado da acção conjunta de diferentes mecanismos de resistência (Walsh *et al.*, 2005). A emergência de MBLs (metalo- $\beta$ -lactamases) adquiridas, em bacilos de Gram-negativo não fermentadores, representa um sério risco epidemiológico (Oh *et al.*, 2003) uma vez que estas enzimas conferem resistência não só aos carbapenemos mas a quase todos os  $\beta$ -lactâmicos, estando frequente-

mente também associadas com a resistência aos aminoglicosídeos (Livermore & Woodford, 2000; Nordmann & Poirel, 2002). Para além disso, os genes que as codificam encontram-se geralmente em elementos genéticos móveis que facilitam a sua disseminação. Vários têm sido os estudos que documentam um aumento global de MBLs em bacilos de Gram-negativo não fermentadores (Nishio *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sader *et al.*, 2005a). Por exemplo, Luzzaro *et al.* (2004b) referem uma prevalência que varia entre 9,8% e 13,4% (dependendo do método de detecção) de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de MBLs. O estudo de Oh *et al.* (2003), que visava identificar MBLs prevalentes na Coreia, mostrou que 31,3% dos isolados de *P. aeruginosa* e 12,9% dos isolados de *A. baumannii*, com reduzida susceptibilidade ao imipenemo e/ou ceftazidima, eram produtores de MBLs. Num outro estudo, 11% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* eram resistentes ao imipenemo, sendo que 8,7% destes isolados apresentava MBLs (Lee *et al.*, 2002). Lee *et al.* (2003) verificaram que dos isolados não susceptíveis ao imipenemo, obtidos maioritariamente em unidades de cuidados intensivos de 28 hospitais, 11,4% de *Pseudomonas* spp. e 14,2% de *Acinetobacter* spp. eram produtores de MBLs.

Uma vez que as bactérias produtoras de MBLs tendem a demonstrar resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, o reconhecimento atempado de isolados produtores de MBLs torna-se crítico para um rigoroso controlo a infecção. Estas bactérias são comumente resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, apresentando, no entanto, e de um modo geral, susceptibilidade às polimixinas. Assim, em muitas situações, a única alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por estirpes de *P. aeruginosa* e de *Acinetobacter* spp. multi-resistentes poderá ser a administração de polimixinas (colistina e polimixina B), agentes terapêuticos não tradicionais, mas cuja eficácia foi recentemente demonstrada (Appleman *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Ouderkirk *et al.*, 2003).

A colistina (polimixina E) foi utilizada entre os anos de 1960 e 1980. Desde então, devido à sua elevada toxicidade (nomeadamente nefro e neurotoxicidade) e ao aparecimento de novos antibióticos menos tóxicos, a sua utilização clínica sistemática foi limitada. Curiosamente, a informação sobre critérios para teste das polimixinas, e respectivos *breakpoints*, foi inclusivamente retirada das normas NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), atendendo

### 1.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS CARBAPENEMOS EM BACILOS DE GRAM-NEGATIVO

---

ao seu uso tão restrito. Contudo, o aparecimento recente, em vários países, de *P. aeruginosa* e de *Acinetobacter* spp. multi-resistentes, em proporções epidêmicas, conduziu ao re-interesse por estas moléculas (principalmente a colistina) e à necessidade de as reconsiderar como opções terapêuticas, uma vez que apresentam uma boa actividade contra estes organismos (Corbella *et al.*, 2000; Catchpole *et al.*, 1997).

#### 1.3.1.1 Importância clínica do género *Acinetobacter*

Os membros do género *Acinetobacter* são bacilos de Gram-negativo, aeróbios, não fermentadores, apresentando uma distribuição ubíqua na natureza, incluindo água, solo, alimentos, fazendo parte também da flora comensal da pele humana (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Seifert *et al.*, 1997). Embora seja considerado um patógeno de relativamente baixa virulência (Schreckenberger *et al.*, 2003), é bem conhecida a sua importância como patógeno nosocomial oportunista, causador de infecções do tracto urinário e respiratório, assim como de bacterémias e meningite, principalmente em doentes imunocomprometidos ou confinados a Unidades de Cuidados Intensivos (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Afzal-Shah & Livermore, 1998). Nos últimos anos têm sido descritos vários surtos nosocomiais causados por membros deste género, em particular por *A. baumannii*, que representam uma preocupação adicional por se caracterizarem por uma elevada capacidade de sobrevivência e de resistência a vários agentes antimicrobianos (Tankovic *et al.*, 1994; Corbella *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2000a). Esta multi-resistência dificulta fortemente o tratamento das infecções, verificando-se que os carbapenemos, ou então associações de antibióticos de diferentes famílias como os  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos, poderão constituir um dos últimos recursos terapêuticos. No entanto, têm sido cada vez mais frequentes as descrições de surtos causados por estirpes resistentes aos carbapenemos (Corbella *et al.*, 2000; Afzal-Shah & Livermore, 1998; Hsueh *et al.*, 2002; Zarrilli *et al.*, 2004; Borgmann *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2005). Em *A. baumannii* a resistência aos carbapenemos tem sido associada à aquisição de carbapenemases (principalmente da classe B e D de Ambler) e também ao efeito sinérgico entre a presença de  $\beta$ -lactamases com capacidade de hidrolisar os carbapenemos e diminuição da expressão de determinadas PBPs (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003). A contribuição da redução da permeabilidade

da membrana exterior para esta resistência está menos caracterizada, embora alguns estudos mostrem uma associação entre a ausência de diferentes proteínas da membrana exterior e a resistência aos carbapenemos em isolados de *A. baumannii* (Bou *et al.*, 2000a; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003). No entanto, nos últimos anos, um dos principais mecanismos associados à resistência ao imipenemo, observada nesta espécie, tem sido a produção de carbapenemases. Embora algumas metalo- $\beta$ -lactamases tenham já sido descritas nesta espécie, nomeadamente IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5 e VIM-2 (Shibata *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2002; Riccio *et al.*, 2000; Yum *et al.*, 2002a), a grande maioria das carbapenemases observadas pertencem à classe D (oxacilinas) tendo sido todas elas descritas em isolados de *A. baumannii* (Donald *et al.*, 2000; Paton *et al.*, 1993; Afzal-Shah *et al.*, 2001; Bou *et al.*, 2000b; Héritier *et al.*, 2003).

#### 1.3.1.2 Importância clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é considerado o patógeno humano mais importante do género *Pseudomonas* no que respeita ao número e tipos de infecções causadas, bem como à morbilidade e mortalidade a elas associadas (Kiska & Gilligan, 2003). É um importante agente de infecções nosocomiais, particularmente nas unidades de cuidados intensivos e unidades de queimados, onde a utilização de agentes antimicrobianos é extremamente intensa, e onde estes patógenos oportunistas são capazes de causar infecções invasivas severas em indivíduos gravemente doentes ou imunocomprometidos (Giamarellou, 2002).

Considera-se, de um modo geral, que a resistência aos carbapenemos observada neste organismo resulta de uma interacção entre baixa permeabilidade, actividade da bomba de efluxo MexA-MexB-OprM e MexXY bem como da actividade de uma  $\beta$ -lactamase cromossómica, AmpC, indutível ou desreprimida (Livermore, 1992, 1993). A contribuição de PBPs alterados para a resistência aos carbapenemos é rara, tendo no entanto sido associada resistência ao imipenemo e PBP-4 com baixa afinidade para este antibiótico (Bellido *et al.*, 1990). Em *P. aeruginosa*, a entrada do imipenemo ocorre através de uma proteína da membrana exterior, a OprD, cuja perda se tem demonstrado representar um papel importante na resistência adquirida ao imipenemo (Livermore & Woodford, 2000). A resistência em *P. aeruginosa* pode também resultar de uma expressão aumentada da bomba

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

---

de efluxo MexA-MexB-OprM, mecanismo que compromete o meropenemo, penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, mas não o imipenemo (Livermore, 2002). Para além disso, metalo- $\beta$ -lactamases, pertencentes à classe B da classificação de Ambler, têm vindo a assumir um papel preponderante na resistência aos carbapenemos observada para esta espécie (Bush, 1998; Nordmann & Poirel, 2002).

### 1.4 Carbapenemases: classificação, estrutura, mecanismos de acção e origem epidemiológica

As enzimas com capacidade hidrolítica sobre os carbapenemos constituem o grupo mais diversificado de todas as  $\beta$ -lactamases, facto que em muito contribui para uma certa subjectividade, visível na literatura, que acompanha o uso do termo carbapenemase. Como exemplo ilustrativo, Livermore (1997) descreve o termo carbapenemase como simultaneamente abrangendo todas as enzimas com capacidade hidrolítica sobre os carbapenemos. Por seu lado, Rasmussen & Bush (1997) confinam o termo às metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) da classe B, que hidrolisam preferencialmente os carbapenemos, enquanto que Laraki *et al.* (1999) sugerem que a única verdadeira carbapenemase é a enzima CphA produzida por *Aeromonas*, e que todas as outras enzimas da classe B são  $\beta$ -lactamases de largo espectro.

As descrições de novas carbapenemases têm vindo a aumentar durante os últimos anos. Este grupo de enzimas é uma mistura heterogénea de  $\beta$ -lactamases pertencentes à classe A (penicilinases), classe B (metalo-enzimas) e classe D (oxacilinases) do sistema de classificação de Ambler. Apresentam em comum a capacidade de hidrolisar, pelo menos parcialmente, o imipenemo ou meropenemo, conjuntamente, ou não, com outras penicilinas ou cefalosporinas (Nordmann & Poirel, 2002). Hidrolisam a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, inactivando assim o antibiótico.

As enzimas que hidrolisam os carbapenemos, pertencentes à classe A, são mais activas contra  $\beta$ -lactâmicos que não os carbapenemos. Algumas  $\beta$ -lactamases da classe C e D apresentam alguma capacidade de hidrólise dos carbapenemos. De um modo geral, não são entendidas como verdadeiras enzimas

inativadoras dos carbapenemos, considerando-se que estes não são o substrato principal do seu perfil hidrolítico (Rasmussen & Bush, 1997), necessitando provavelmente da presença de um mecanismo adicional de resistência, como uma diminuição da permeabilidade, para causar resistência aos carbapenemos. No entanto, estudos recentes de Hérítier *et al.* (2005b) evidenciam o papel das oxacilinas OXA-23, OXA-40 e OXA-58 na resistência de *A. baumannii* aos carbapenemos.

#### 1.4.1 Carbapenemases da classe A (grupo 2f da classificação de Bush)

As  $\beta$ -lactamases que hidrolisam os carbapenemos, pertencentes à classe A de Ambler (1980) e ao grupo 2f da classificação de Bush *et al.* (1995), representam um pequeno grupo (Rasmussen & Bush, 1997) e têm sido descritas de uma forma rara em isolados de *Enterobacteriaceae* (Thomson & Moland, 2000). Estas enzimas apresentam um resíduo de serina no centro activo e caracterizam-se por um elevado nível de resistência ao aztreonamo, resistência variável às cefalosporinas de 3ª geração e ainda por uma susceptibilidade quase geral à inibição pelo ácido clavulânico e tazobactam. Nove enzimas pertencentes a este grupo foram já descritas: NMC-A (Nordmann *et al.*, 1993), Sme-1 (Naas *et al.*, 1994), Sme-2 (Queenan *et al.*, 2000), Sme-3 (Queenan *et al.*, 2000), IMI-1 (Rasmussen *et al.*, 1996), KPC-1 (Yigit *et al.*, 2001), KPC-2 (Moland *et al.*, 2003), KPC-3 (Woodford *et al.*, 2004) e GES-2 (Poirol *et al.*, 2001b). Todas estas enzimas hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas, aztreonamo e carbapenemos (Livermore & Woodford, 2000). Contudo, a família KPC difere do resto do grupo por conferir maior resistência às cefalosporinas do que aos carbapenemos (Miriagou *et al.*, 2003b; Yigit *et al.*, 2001).

**Sme-1** A enzima Sme-1 foi identificada em dois isolados de *Serratia marcescens* obtidos em Londres, em 1982 (Yang *et al.*, 1990; Naas *et al.*, 1994), antes da utilização clínica geral dos carbapenemos ter sido aprovada (Rasmussen & Bush, 1997). O gene *bla*<sub>Sme-1</sub> não apresentava localização plasmídica, nem mesmo em integrões ou transposões, verificando-se que estava localizado e codificado a nível cromossómico (Thomson & Moland, 2000).

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

---

**Sme-2 e Sme-3** Mais recentemente, as  $\beta$ -lactamases Sme-2 e Sme-3, derivadas por mutações pontuais da Sme-1, foram identificadas em estirpes de *S. marcescens* provenientes de diferentes localizações geográficas dentro do território dos Estados Unidos da América (Queenan *et al.*, 2000). Estudos comparativos entre os vários isolados de *S. marcescens* que possuem enzimas do tipo Sme, sugerem uma disseminação global de um subtipo distinto de *S. marcescens* (Gales *et al.*, 2001a).

**NMC-A** A enzima NMC-A foi identificada num isolado clínico de *Enterobacter cloacae*, em 1990, num doente tratado com imipenemo (Nordmann *et al.*, 1993). Esta enzima, que apresenta uma identidade aminoacídica de 68% com a enzima Sme-1, é codificada por um gene indutível localizado no cromossoma.

**IMI-1** A enzima IMI-1 foi identificada em dois isolados de *E. cloacae*, em 1984, nos Estados Unidos da América (Rasmussen *et al.*, 1996). As enzimas IMI-1 e NMC-A são, do ponto de vista molecular, relacionadas, partilhando 95% de identidade aminoacídica e apresentando perfis de hidrólise bastante similares. Ambas são indutíveis e não transferíveis (Nordmann & Poirel, 2002).

**KPC-1** A enzima KPC-1 foi identificada, nos Estados Unidos da América, num isolado de *Klebsiella pneumoniae* que apresentava resistência aos carbapenemos, cefalosporinas de largo espectro e aztreonamo (Yigit *et al.*, 2001). Comparada com as carbapenemases cromossómicas da classe A, esta enzima apresenta uma maior inibição da sua actividade pelo ácido clavulânico e tazobactam e a sua expressão não é indutível. KPC-1 apresenta uma baixa identidade aminoacídica com as enzimas Sme-1 (45%), NMC-A (44%) e IMI-1 (43%). A descoberta da *bla*<sub>KPC-1</sub> representa um problema adicional uma vez que se verificou ser codificada por um plasmídeo transferível.

**KPC-2 e KPC-3** A enzima KPC-2 foi descrita em isolados de *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Salmonella*, nos Estados Unidos da América (Moland *et al.*, 2003; Miriagou *et al.*, 2003b; Yigit *et al.*, 2003; Bradford *et al.*, 2004). Mais recentemente, foi descrito um surto, também nos EUA, causado por

estirpes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos, capazes de produzir uma outra variante de KPC, designada KPC-3 (Woodford *et al.*, 2004) com localização plasmídica.

**GES-2** A carbapenemase GES-2, que deriva de uma mutação pontual da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado (ESBL) GES-1, foi descrita numa estirpe de *P. aeruginosa* isolada na África do Sul (Poirel *et al.*, 2001b). Análises de cinética evidenciaram uma eficiência catalítica contra o imipenemo 100 vezes superior à da enzima GES-1. Contudo, a actividade da GES-2 sobre o meropenemo mantém-se 1000 vezes menor do que a apresentada pelas enzimas Sme-1 e NMC-A. A identificação da GES-2 salientou ainda o facto de que as ESBLs da classe A se podem tornar carbapenemases, ainda que fracas, através de uma simples substituição aminoacídica (Nordmann & Poirel, 2002). Este é também o caso da enzima SHV-38, derivada de SHV-1, o primeiro exemplo de uma enzima do tipo SHV com capacidade de hidrolisar o imipenemo (Poirel *et al.*, 2003). Para além da particularidade do gene *bla*<sub>GES-2</sub> se encontrar num plasmídeo, tal como verificado para o gene *bla*<sub>KPC-1</sub>, também faz parte de uma cassette de genes localizada num integrão de classe 1.

A existência de enzimas com actividade sobre os carbapenemos mediadas por plasmídeos poderá tornar-se um problema com relevância clínica, principalmente em espécies como *E. cloacae* e *P. aeruginosa* que possuem naturalmente, ou adquirem, mecanismos adicionais de resistência aos carbapenemos, como diminuição da permeabilidade e/ou existência de bombas de efluxo.

### 1.4.2 Metallo-enzimas da classe B (grupo 3 da classificação de Bush)

Existem várias  $\beta$ -lactamases capazes de mediar a resistência às penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Bush *et al.*, 1995). No entanto, as mais "temíveis" são as metallo- $\beta$ -lactamases que tornam quase todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos ineficazes contra as estirpes bacterianas que possuem estas enzimas (Bush, 1998; Livermore & Woodford, 2000; Nordmann & Poirel, 2002), inviabilizando a eficácia terapêutica dos carbapenemos, de utilização restrita ao ambiente hospitalar. Para além disso, e embora estas enzimas se encontrem essencial-

## 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

---

mente associadas a bacilos de Gram-negativo não fermentadores, pertencentes aos géneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, recentemente tem sido possível verificar a sua disseminação também para bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Miriagou *et al.*, 2003a; Scoulica *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; Yum *et al.*, 2002b; Luzzaro *et al.*, 2004a). A disseminação das MBLs, principalmente do tipo IMP e VIM, tem sido verificada não só a nível de espécies bacterianas mas também de distribuição geográfica, surgindo na Europa, América e Ásia (Gibb *et al.*, 2002; Yum *et al.*, 2002a; Gales *et al.*, 2003b; Giske *et al.*, 2003; Sardelic *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003; Toleman *et al.*, 2003, 2004; Walsh *et al.*, 2003). Muitas MBLs são codificadas por genes localizados no cromossoma, mas algumas estão associadas a elementos genéticos móveis o que facilita e contribui para a sua disseminação.

### 1.4.2.1 Classificação das MBLs

As metalo- $\beta$ -lactamases, inicialmente categorizadas, em 1980, como  $\beta$ -lactamases do tipo serina, segundo o esquema de classificação proposto por Ambler (baseado em homologia de sequências aminoacídicas), foram posteriormente classificadas como um grupo à parte (grupo 3) de acordo com as suas propriedades funcionais (Bush, 1989), nomeadamente a capacidade de hidrolisar facilmente o imipenemo, a susceptibilidade exibida a quelantes de iões metálicos, como o EDTA, e finalmente pela capacidade de escaparem à acção dos inibidores de  $\beta$ -lactamases disponíveis, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Este esquema, primariamente baseado no perfil de substratos e inibidores, foi actualizado em 1995 (Bush *et al.*, 1995) e modificado em 1997 (Rasmussen & Bush, 1997) por forma a incluir o crescente número de enzimas do grupo 3. Assim, estas enzimas foram subdivididas em três subgrupos, com base na hidrólise do imipenemo e de outros  $\beta$ -lactâmicos:

- o grupo 3a que engloba enzimas com um espectro alargado de actividade hidrolítica (exemplos: IMP-1 de *P. aeruginosa* e *S. marcescens* (Watanabe *et al.*, 1991; Osano *et al.*, 1994) e SPM-1 de *P. aeruginosa* (Toleman *et al.*, 2002));
- o grupo 3b que contem as "verdadeiras carbapenemases", enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenemos (exemplos: CphA de *A. hy-*

*drophila* (Rasmussen & Bush, 1997) e Sfh-1 de *Serratia fonticola* (Saavedra *et al.*, 2003));

- e o grupo 3c que inclui enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenemos, quando comparado com outros  $\beta$ -lactâmicos.

Do ponto de vista molecular, as MBLs são enzimas muito heterogêneas o que torna a sua classificação e a uniformização das suas estruturas extremamente difícil. Assim, não é de estranhar que vários esquemas de classificação surjam continuamente (Bush *et al.*, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Galleni *et al.*, 2001; Garau *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2003, 2004), tendo sido recentemente proposto um novo esquema de numeração para incluir as novas MBLs descobertas (Garau *et al.*, 2004). Assim, e com base nas características estruturais e sequências conhecidas, as MBLs são agora agrupadas em dois subgrupos: o primeiro engloba os grupos B1 (reúne as MBLs transferíveis, IMP, VIM, GIM e SPM-1) e B2, e o segundo diz respeito ao grupo B3 (Walsh *et al.*, 2005; Garau *et al.*, 2005).

**1.4.2.1.1 MBLs cromossômicas** As metalo-enzimas têm sido descritas como ocorrendo de forma natural e ubíqua em várias espécies bacterianas, geralmente provenientes do ambiente aquático (Walsh *et al.*, 2005). As primeiras MBLs (BC II) foram descritas em meados dos anos 60 em estirpes de *B. cereus* (Sabath & Abraham, 1966) e posteriormente, já na década de 80, em *S. maltophilia* (Saino *et al.*, 1982), *Aeromonas hydrophila* (Shannon *et al.*, 1986) e *Bacteroides fragilis* (Cuchural *et al.*, 1986). Estas enzimas da classe B, de ocorrência natural, são codificadas por genes localizados no cromossoma e, portanto, de disseminação muito restrita, e têm sido associadas a bactérias menos frequentes em infecções humanas. Na Tabela 1.1 encontram-se listadas as MBLs codificadas no cromossoma que têm sido descritas, nos últimos anos, cada vez com maior frequência.

**1.4.2.1.2 MBLs transferíveis** As MBLs adquiridas com importância clínica reconhecida em bacilos de Gram-negativo compreendem às do tipo IMP (com 21 alelos conhecidos, até ao presente momento), VIM (com 12 variantes conhecidas) e as recentemente descritas  $\beta$ -lactamases SPM e GIM. Enquanto que estas duas últimas se encontram restritas ao Brasil (Toleman *et al.*, 2002; Gales *et al.*, 2003a)

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

Tabela 1.1: Metallo- $\beta$ -lactamases cromossómicas (adaptado de Walsh *et al.*, 2005)

| Subgrupo | Organismo                               | Enzima                             |
|----------|-----------------------------------------|------------------------------------|
| B1       | <i>Bacillus cereus</i>                  | BCII-5/B/6; BCII-569/H             |
|          | <i>Bacillus anthracis</i>               | Bla2                               |
|          | Alkalophilic <i>Bacillus</i> spp.       | Bce 170                            |
|          | <i>Chryseobacterium indologenes</i>     | IND-1; IND-2; IND-2a; IND-3; IND-4 |
|          | <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | BlaB; BlaB2; BlaB3; BlaB4-8        |
|          | <i>Chryseobacterium gleum</i>           | CGB-1                              |
|          | <i>Myroides odoratus</i>                | TUS-1                              |
|          | <i>Myroides odoratimimus</i>            | MUS-1                              |
|          | <i>Flavobacterium johnsoniae</i>        | JOHN-1                             |
| B2       | <i>Aeromonas hydrophila</i>             | CphA                               |
|          | <i>Aeromonas veronii</i>                | ImiS; AsbM1                        |
|          | <i>Serratia fonticola</i>               | Sfh-1                              |
| B3       | <i>Caulobacter crescentus</i>           | Mb11B; CAU-1                       |
|          | <i>Janthinobacterium lividium</i>       | THIN-B                             |
|          | <i>Legionella gormanii</i>              | FEZ-1                              |
|          | <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | GOB-1-7                            |
|          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>     | L1a; L1-BlaS; L1c; L1d; L1e        |

e Alemanha (Castanheira *et al.*, 2004), respectivamente, as enzimas do tipo IMP e VIM têm vindo a ser descritas de uma forma continuada, estando amplamente disseminadas um pouco por todo o mundo. Embora as estirpes produtoras de MBLs sejam geralmente descritas de uma forma esporádica, ou mesmo associadas a pequenos surtos nosocomiais (Osano *et al.*, 1994; Senda *et al.*, 1996b; Cornaglia *et al.*, 2000), alguns surtos relevantes causados por clones de *P. aeruginosa* produtores de MBLs foram já relatados na Grécia (Tsakris *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2003), em Itália (Lagatolla *et al.*, 2004; Pagani *et al.*, 2005) e na América (Gales *et al.*, 2003a; Crespo *et al.*, 2004).

**MBLs do tipo IMP** A primeira indicação da existência de MBLs móveis surgiu no Japão, em 1991, com a descrição, num isolado de *P. aeruginosa*, de

uma MBL codificada por um gene com localização num plasmídeo conjugativo transferível (Watanabe *et al.*, 1991). Os autores caracterizaram bioquimicamente a enzima, sem no entanto apresentarem o resultado de qualquer sequenciação. No entanto, pensa-se tratar-se da enzima IMP-1 que foi, anos mais tarde, caracterizada e sequenciada em estirpes de *S. marcescens*, isoladas também no Japão (Osano *et al.*, 1994; Arakawa *et al.*, 1995), cujo gene *bla<sub>IMP-1</sub>* foi associado a um integrão localizado num plasmídeo. Este facto veio alterar opiniões pré-estabelecidas que tendencialmente minoravam o significado das MBLs. Existia agora a possibilidade de disseminação destas enzimas entre bactérias patogénicas. Estudos posteriores conduzidos no Japão mostraram que a enzima IMP-1 se encontrava já disseminada pelo país. Um estudo realizado em sete hospitais japoneses, em 1993, identificou quatro isolados de *S. marcescens* que apresentavam o gene *bla<sub>IMP-1</sub>* (Ito *et al.*, 1995). Num outro estudo foi realizado o *screening* da presença do gene *bla<sub>IMP-1</sub>* em 3700 isolados de *P. aeruginosa* obtidos no Japão, entre 1992 e 1994, em 17 hospitais, verificando-se a existência desta enzima em 15 estirpes provenientes de 5 hospitais geograficamente distantes (Senda *et al.*, 1996b). Simultaneamente, foram ainda identificados, por PCR, em estirpes provenientes de 18 hospitais no Japão, 22 isolados com *bla<sub>IMP-1</sub>*, incluindo *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *S. marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans* e *K. pneumoniae* (Senda *et al.*, 1996a). Mais estudos, ainda no Japão, relataram uma ampla dispersão de genes que codificam MBLs, alguns associados a integrões de classe 3, em 16 espécies diferentes de Gram-negativos (Shibata *et al.*, 2003). Embora a maioria das descrições de isolados produtores de IMP-1 procedam do Japão, recentemente têm surgido referências da sua presença em isolados provenientes de outros países, nomeadamente em estirpes de *K. pneumoniae* e *Pseudomonas fluorescens*, isoladas em Singapura (Koh *et al.*, 2001, 2004) e em *A. junii* no Reino Unido (Tysall *et al.*, 2002). Cornaglia *et al.* (1999) descreveram a presença de uma estirpe de *A. baumannii* produtora de IMP-1, num doente italiano, tendo, no entanto, sido verificado mais tarde, tratar-se do gene que codifica para IMP-2, uma enzima variante apresentando 85% de homologia com a IMP-1 (Riccio *et al.*, 2000).

A maioria das enzimas variantes de IMP-1 foi encontrada em isolados clínicos do Sudoeste Asiático (ver Tabela 1.2). IMP-3, IMP-6 e IMP-10, as três enzimas com menor variação relativamente a IMP-1, foram identificadas no Japão em iso-

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

lados de *Shigella flexneri* (Iyobe *et al.*, 2000), *S. marcescens* (Yano *et al.*, 2001) e *P. aeruginosa* e *A. xylosoxidans* (Iyobe *et al.*, 2002), respectivamente. Estudos retrospectivos de isolados resistentes obtidos em Hong Kong permitiram associar a resistência aos carbapenemos à presença da enzima IMP-4 em *Acinetobacter* spp. (Chu *et al.*, 2001). O gene *bla<sub>IMP-4</sub>* foi subsequentemente encontrado numa estirpe de *Citrobacter youngae*, na China (Hawkey *et al.*, 2001). Em Taiwan, foi descrita, num isolado clínico de *K. pneumoniae*, a variante IMP-8 (Yan *et al.*, 2001a), mais semelhante a IMP-2 (com uma diferença de apenas 2 aminoácidos) do que a IMP-1, sugerindo a não existência de uma relação clara com os isolados japoneses produtores de IMP-1. Algumas variantes de IMP têm surgido noutros continentes: *bla<sub>IMP-2</sub>* em Itália, num isolado clínico de *A. baumannii* (Riccio *et al.*, 2000), *bla<sub>IMP-5</sub>*, em Portugal (Da Silva *et al.*, 2002), também num isolado clínico de *A. baumannii*, *bla<sub>IMP-7</sub>* em isolados de *P. aeruginosa* do Canadá, responsáveis por um surto infeccioso (Gibb *et al.*, 2002), *bla<sub>IMP-4</sub>* na Austrália (Peleg *et al.*, 2004), *bla<sub>IMP-12</sub>* (divergente da IMP-1, com 36 diferenças aminoácídicas), em Itália, num isolado clínico de *P. putida* (Docquier *et al.*, 2003), *bla<sub>IMP-13</sub>* identificada também em Itália num isolado clínico de *P. aeruginosa* (Toleman *et al.*, 2003), *bla<sub>IMP-16</sub>* no Brasil (Mendes *et al.*, 2004b) e a mais recente MBL do tipo IMP, IMP-18, identificada num isolado de *P. aeruginosa* no Novo México (Hanson *et al.*, 2004).

Tabela 1.2: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo IMP (adaptado de Walsh *et al.*, 2005)

| Designação da MBL | Organismo                      | Origem (nº GenBank)   |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------|
| IMP-1             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Japão, Brasil, Coreia |
|                   | <i>Pseudomonas putida</i>      | Japão, Singapura      |
|                   | <i>Serratia marcescens</i>     | Japão                 |
|                   | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Coreia, Japão         |
|                   | <i>Acinetobacter junii</i>     | Reino Unido           |
|                   | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Singapura, Japão      |
|                   | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | Japão                 |
|                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | Japão                 |
| continua...       |                                |                       |

Tabela 1.2: Metalo- $\beta$ -lactamases do tipo IMP (adaptado de Walsh *et al.*, 2005) (cont.)

| Designação da MBL | Organismo                       | Origem (nº GenBank) |
|-------------------|---------------------------------|---------------------|
|                   | <i>Klebsiella oxytoca</i>       | Japão               |
|                   | <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> | Japão               |
|                   | <i>Alcaligenes faecalis</i>     | Japão               |
|                   | <i>Citrobacter freundii</i>     | Japão               |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>     | Japão               |
|                   | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | Japão               |
|                   | <i>Escherichia coli</i>         | Japão               |
|                   | <i>Providencia rettgeri</i>     | Japão               |
| IMP-2             | <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Itália, Japão       |
|                   | <i>Acinetobacter lwoffii</i>    | Japão               |
| IMP-3             | <i>Shigella flexneri</i>        | Japão               |
| IMP-4             | <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Hong Kong           |
|                   | <i>Citrobacter youngae</i>      | China               |
| IMP-5             | <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Portugal            |
| IMP-6             | <i>Serratia marcescens</i>      | Japão               |
|                   | <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Brasil              |
| IMP-7             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Canadá, Malásia     |
| IMP-8             | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | Taiwan              |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>     | Taiwan              |
| IMP-9             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | China               |
| IMP-10            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Japão               |
|                   | <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> | Japão               |
| IMP-11            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Japão               |
|                   | <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Japão               |
| IMP-12            | <i>Pseudomonas putida</i>       | Itália              |
| IMP-13            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Itália              |
| IMP-16            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Brasil              |
| IMP-18            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | USA                 |
| IMP-19            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Japão (AB184976)    |
| continua...       |                                 |                     |

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

Tabela 1.2: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo IMP (adaptado de Walsh *et al.*, 2005) (cont.)

| Designação da MBL | Organismo                         | Origem (nº GenBank) |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|
|                   | <i>Pseudomonas putida</i>         | Japão (AB201265)    |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>       | Japão (AB201264)    |
|                   | <i>Acinetobacter baumannii</i>    | Japão (AB184977)    |
|                   | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> | Japão (AB201263)    |
| IMP-20            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Japão (AB196988)    |
| IMP-21            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Japão (AB204557)    |

**MBLs do tipo VIM** O segundo grupo dominante de MBLs adquiridas engloba as enzimas do tipo VIM (Walsh *et al.*, 2005) (ver Tabela 1.3). Foram já descritas onze variantes das enzimas tipo VIM, constituindo três *clusters* principais representados pela VIM-1, VIM-2 e VIM-7 (a mais divergente) (Walsh *et al.*, 2005). VIM-1<sup>3</sup> foi inicialmente descrita em Verona, Itália, num isolado clínico de *P. aeruginosa*, obtido em 1997 (Lauretti *et al.*, 1999), que apresentava resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo piperacilina, ceftazidima e imipenemo. As análises bioquímicas realizadas com extractos brutos desta bactéria revelaram uma actividade hidrolítica sobre os carbapenemos que era inibida pelo EDTA e restaurada após adição de  $Zn^{2+}$ , sugerindo a produção de uma metallo-enzima. O gene da  $\beta$ -lactamase foi clonado e a respectiva sequenciação revelou a presença de uma proteína com 266 aminoácidos e pI 5,3. Esta nova enzima apresentava uma baixa homologia com outras metallo-enzimas, nomeadamente 31% com a enzima IMP-1, justificando-se a definição de uma nova família de MBLs (Lauretti *et al.*, 1999). O gene *bla<sub>VIM-1</sub>* estava associado a um integrão de classe 1, à semelhança do verificado com os genes *bla<sub>IMP</sub>*, que apresentava, para além da cassette com o gene *bla<sub>VIM-1</sub>*, uma cassette com um gene que codifica a resistência aos aminoglicosídeos (*aacA4*). Verificou-se ainda que este integrão apresentava uma localização cromossómica (Lauretti *et al.*, 1999). Apesar da baixa homolo-

<sup>3</sup>VIM, de Verona imipenemase

gia, as duas famílias, VIM e IMP, apresentam idêntico espectro hidrolítico alargado (Livermore & Woodford, 2000), hidrolisando penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos (mas não o aztreonamo) (Walsh *et al.*, 2005). Para além disso, e tal como verificado para os genes *bla<sub>IMP</sub>*, também os genes que codificam as enzimas do tipo VIM são parte integrante de cassetes inseridas em integrões. Mais tarde, o gene *bla<sub>VIM-1</sub>* foi também encontrado num isolado de *Achromobacter xylosoxidans* do mesmo hospital italiano, em Verona, (Riccio *et al.*, 2001). Este isolado apresentava resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenemos, e possuía um plasmídeo não-conjugativo contendo um integrão de classe 1 (In70). Este integrão apresentava quatro cassetes de genes, contendo três genes de resistência aos aminoglicosídeos diferentes (*aacA4*, *aphA15* e *aadA1*), localizadas logo após a cassette contendo o gene *bla<sub>VIM-1</sub>*. Adicionalmente, a enzima VIM-1 foi detectada em três isolados de *P. putida*, clonalmente relacionados, associados a infecções nosocomiais, verificando-se que, também neste caso, o determinante de resistência se localizava num plasmídeo (Lombardi *et al.*, 2002). Entretanto, surtos infecciosos por isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-1 foram descritos na Grécia e em Itália (Tsakris *et al.*, 2000; Cornaglia *et al.*, 2000), tendo-se começado a verificar que o problema da disseminação de MBLs, tão preocupante em hospitais japoneses, era agora um fenómeno a emergir também na Europa. Recentemente, a enzima VIM-1 foi também descrita em *E. coli* e em alguns isolados de *K. pneumoniae*, na Grécia (Scoulica *et al.*, 2004; Giakkoupi *et al.*, 2003b).

Tabela 1.3: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM

| Designação da MBL | Organismo                         | Perfil demográfico |                 | Referência ou nº de acesso do GenBank                           |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
|                   |                                   | Origem             | Anos            |                                                                 |
| VIM-1             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Itália             | 1997,1998       | (Lauretti <i>et al.</i> , 1999; Cornaglia <i>et al.</i> , 2000) |
|                   |                                   | Grécia             | 1996-1998, 2001 | (Tsakris <i>et al.</i> , 2000; Giakkoupi <i>et al.</i> , 2003a) |
|                   | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> | Itália             | 1998            | (Riccio <i>et al.</i> , 2001)                                   |
| continua...       |                                   |                    |                 |                                                                 |

# 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

Tabela 1.3: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM (cont.)

| Designação da MBL | Organismo                              | Perfil demográfico |                      | Referência ou nº de acesso do GenBank                             |
|-------------------|----------------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                   |                                        | Origem             | Anos                 |                                                                   |
| VIM-2             | <i>Escherichia coli</i>                | Grécia             | 2001                 | (Miriagou <i>et al.</i> , 2003a; Scoulica <i>et al.</i> , 2004)   |
|                   |                                        | Espanha            | 2003                 | (Tórtola <i>et al.</i> , 2005)                                    |
|                   | <i>Pseudomonas putida</i>              | Itália             | 1999-2000            | (Lombardi <i>et al.</i> , 2002)                                   |
|                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | Grécia             | 2002                 | (Giakkoupi <i>et al.</i> , 2003b)                                 |
|                   |                                        | Espanha            | 2003                 | (Tórtola <i>et al.</i> , 2005)                                    |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>            | Grécia             | 2003                 | (Galani <i>et al.</i> , 2005)                                     |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | Portugal           | 1995,1998            | (Cardoso <i>et al.</i> , 2002)                                    |
|                   |                                        | França             | 1996, 1997,1998      | (Poirel <i>et al.</i> , 2000b, 2001a)                             |
|                   |                                        | Grécia             | 1998-2000, 2000-2001 | (Tsakris <i>et al.</i> , 2003; Pour-naras <i>et al.</i> , 2003)   |
|                   |                                        | Itália             | 1998                 | (Pallecchi <i>et al.</i> , 2001)                                  |
|                   |                                        | Japão              | 2001-2002, 2001-2003 | (Shibata <i>et al.</i> , 2003; Yatsuyanagi <i>et al.</i> , 2004b) |
|                   |                                        | Coreia             | 1995-1999            | (Lee <i>et al.</i> , 2002)                                        |
|                   |                                        | Croácia            | 2000                 | (Sardelic <i>et al.</i> , 2003)                                   |
|                   |                                        | Polónia            |                      | (Walsh <i>et al.</i> , 2003)                                      |
|                   |                                        | Venezuela          | 2002                 | (Mendes <i>et al.</i> , 2004a)                                    |
|                   |                                        | Espanha            |                      | (Prats <i>et al.</i> , 2002)                                      |
|                   |                                        | EUA                | 2003                 | (Lolans <i>et al.</i> , 2005)                                     |
|                   |                                        | Alemanha           | 2003                 | (Henrichfreise <i>et al.</i> , 2005)                              |
|                   |                                        | Arábia Saudita     |                      | (Guerin <i>et al.</i> , 2005)                                     |
|                   | <i>Klebsiella oxytoca</i>              | Portugal           |                      | (Conceição <i>et al.</i> , 2005)                                  |
|                   | <i>Acinetobacter baumannii</i>         | Coreia             | 1998-1999            | (Yum <i>et al.</i> , 2002a)                                       |
|                   | <i>Acinetobacter</i> espécie genómica3 | Coreia             | 1998-1999            | (Yum <i>et al.</i> , 2002a)                                       |
|                   | continua...                            |                    |                      |                                                                   |

Tabela 1.3: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM (cont.)

| Designação da MBL | Organismo                      | Perfil demográfico |                 | Referência ou nº de acesso do GenBank  |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------------|
|                   |                                | Origem             | Anos            |                                        |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>    | Coreia             | 2000            | (Jeong <i>et al.</i> , 2003)           |
|                   | <i>Serratia marcescens</i>     | Coreia             | 2000            | (Yum <i>et al.</i> , 2002b)            |
|                   | <i>Pseudomonas putida</i>      | Coreia             | 1997-1999       | (Lee <i>et al.</i> , 2002)             |
|                   |                                | Japão              | 2001-2002       | (Shibata <i>et al.</i> , 2003)         |
|                   |                                | Taiwan             | 1998-2000       | (Yan <i>et al.</i> , 2001b)            |
|                   |                                | Grécia             | 1998-2000       | (Tsakris <i>et al.</i> , 2003)         |
|                   | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Chile              | 2002            | (Mendes <i>et al.</i> , 2004a)         |
|                   | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | Taiwan             | 2000            | (Yan <i>et al.</i> , 2001b)            |
|                   | <i>Citrobacter freundii</i>    | Taiwan             | 2000            | (Yan <i>et al.</i> , 2002)             |
|                   | <i>Escherichia coli</i>        | Grécia             | 2001            | (Galani <i>et al.</i> , 2004)          |
| VIM-3             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Taiwan             | 1997-2000       | (Yan <i>et al.</i> , 2001b)            |
| VIM-4             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Grécia             | 2001, 2000-2001 | (Pournaras <i>et al.</i> , 2002, 2003) |
|                   |                                | Suécia             | 2001            | (Giske <i>et al.</i> , 2003)           |
|                   |                                | Hungria            | 2002            | (Libisch <i>et al.</i> , 2004)         |
|                   |                                | Polónia            | 1998-2001       | (Patzner <i>et al.</i> , 2004)         |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>    | Itália             | 2002            | (Luzzaro <i>et al.</i> , 2004a)        |
|                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | Itália             | 2002            | (Luzzaro <i>et al.</i> , 2004a)        |
| VIM-5             | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | Turquia            |                 | AY144612                               |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Turquia            | 2003            | (Bahar <i>et al.</i> , 2004)           |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>    | Turquia            | 2002            | (Gacar <i>et al.</i> , 2005)           |
| VIM-6             | <i>Pseudomonas putida</i>      | Singapura          | 2000            | (Koh <i>et al.</i> , 2004)             |
| VIM-7             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | EUA                | 2001            | (Toleman <i>et al.</i> , 2004)         |
| VIM-8             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Colombia           | 1997-2003       | (Crespo <i>et al.</i> , 2004)          |
| VIM-9             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Reino Unido        |                 | AY524988                               |
| VIM-10            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Reino Unido        |                 | AY524989                               |
| VIM-11            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Argentina          | 2002            | (Pasteran <i>et al.</i> , 2005)        |

continua...

#### 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

Tabela 1.3: Metallo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM (cont.)

| Designação da MBL | Organismo                         | Perfil demográfico |      | Referência ou nº de acesso do GenBank |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|------|---------------------------------------|
|                   |                                   | Origem             | Anos |                                       |
|                   | <i>Acinetobacter haemolyticus</i> | Taiwan             |      | DQ022682                              |
| VIM-12            | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | Grécia             |      | DQ143913                              |

A enzima VIM-2, uma variante do tipo VIM, foi descrita pela primeira vez em 2000 por Poirel *et al.* (2000b), embora o isolado mais antigo produtor de *bla<sub>VIM-2</sub>* date de 1995 e tenha sido identificado em Portugal (Cardoso *et al.*, 2002). Esta enzima partilha 90% de homologia com a VIM-1 e foi associada a um plasmídeo não-conjugativo e a um integrão de classe 1 (In56) (Poirel *et al.*, 2000b). Desde então, vários têm sido os relatos de isolados de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e outros Gram negativos não fermentadores, produtores de VIM-2, considerado o tipo de VIM mais importante e cosmopolita (Walsh *et al.*, 2005), demonstrando que esta enzima se encontra amplamente disseminada aparecendo na Ásia (Yatsuyanagi *et al.*, 2004a; Yum *et al.*, 2002b; Jeong *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2002; Guerin *et al.*, 2005), Europa (Cardoso *et al.*, 2002; Prats *et al.*, 2002; Sardelic *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003; Pallecchi *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2000b, 2001a) e América (Mendes *et al.*, 2004a; Lolans *et al.*, 2005). Recentemente, esta enzima foi descrita em isolados clínicos de *K. oxytoca* provenientes de um hospital pediátrico em Portugal (Conceição *et al.*, 2005).

Uma terceira variante (VIM-3), com alteração em dois aminoácidos relativamente a VIM-2, foi identificada em Taiwan em isolados de *P. aeruginosa* (Yan *et al.*, 2001b).

Mais tarde, foi descrita a enzima VIM-4, diferindo numa única alteração aminoácídica da VIM-1, numa estirpe de *P. aeruginosa* isolada na Grécia (Pournaras *et al.*, 2002) e, curiosamente, um outro isolado de *P. aeruginosa* produtor de VIM-4 foi também identificado na Suécia, mas desta vez num paciente que provinha da Grécia. O gene *bla<sub>VIM-4</sub>* foi ainda identificado em isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, de um doente em Itália, e em estirpes de *P. aeruginosa* isoladas de crianças hospitalizadas na Polónia. Em 2004, Bahar *et al.* (2004)

e Koh *et al.* (2004) descrevem novas variantes, a VIM-5 e a VIM-6, em isolados de *P. aeruginosa* na Turquia e em *P. putida* em Singapura, respectivamente. Ainda nesse mesmo ano são caracterizadas a VIM-7 nos Estados Unidos (Toleman *et al.*, 2004) e a VIM-8 na Colômbia (Crespo *et al.*, 2004) em isolados de *P. aeruginosa*. A VIM-7 partilha apenas 77% de identidade com a VIM-1 e 74% com a VIM-2, pelo que constitui um terceiro subgrupo dentro das enzimas tipo VIM (Walsh *et al.*, 2005). Várias têm sido as sequências de novos genes, que codificam enzimas do tipo VIM, submetidas à base de dados do GenBank, embora algumas ainda não tenham sido formalmente publicadas (Tabela 1.3). A última MBL do tipo VIM a ser caracterizada foi a VIM-11, identificada numa estirpe de *P. aeruginosa* isolada na Argentina (Pasteran *et al.*, 2005).

Embora as enzimas VIM-1 e VIM-2 tenham sido identificadas em espécies da família *Enterobacteriaceae*, o reservatório predominante destas enzimas é sem dúvida *P. aeruginosa* (Tabela 1.3).

**Metalo- $\beta$ -lactamase SPM-1** Em 2002, um novo gene designado *bla<sub>SPM-1</sub>*<sup>4</sup> foi identificado, no Brasil, num isolado clínico de *P. aeruginosa* que apresentava susceptibilidade apenas à polimixina B (Toleman *et al.*, 2002). Quando a sequência da enzima SPM-1 foi comparada com a de outras metalo- $\beta$ -lactamases, verificou-se que apresentava as maiores homologias com as seguintes enzimas: 35% com a IMP-1, 32,2% com a ImiS, 32,1% com a CphA, 30% com a BCII e 27% com a CcrA (Toleman *et al.*, 2002), sendo assim considerada uma nova metalo- $\beta$ -lactamase. A sequência da enzima SPM-1 é muito diferente das de IMP e VIM. O contexto genético do gene *bla<sub>SPM-1</sub>* difere também, pois não foi associado a nenhum integração ou transposição (Toleman *et al.*, 2002), embora Poirrel *et al.* (2004) tenham, recentemente, associado este gene a uma nova região (CR4) que poderá estar envolvida na sua mobilização e expressão.

**Metalo- $\beta$ -lactamase GIM-1** O quarto tipo de MBL adquirida, a GIM-1<sup>5</sup>, foi recentemente descrito, na Alemanha, em cinco isolados de *P. aeruginosa* clonalmente relacionados e que apresentavam susceptibilidade apenas à polimixina

<sup>4</sup>SPM, de São Paulo Metalo- $\beta$ -lactamase

<sup>5</sup>GIM, de German Imipenemase

## 1.4. CARBAPENEMASES: CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA, MECANISMOS DE ACÇÃO E ORIGEM EPIDEMIOLÓGICA

---

B (Castanheira *et al.*, 2004). A sequência aminoacídica desta enzima apresenta uma maior homologia com as variantes IMP-6 (43,5%), IMP-1 (43,1%) e IMP-4 (43,1%). A homologia com as variantes de VIM alternaram entre 31,2% (com a VIM-7) e 28,8% (com a VIM-1, VIM-4 e VIM-5). Quando comparada com a enzima SPM-1, verifica-se uma similaridade de apenas 28%. Tal como acontece com a maioria dos genes que codificam para MBLs adquiridas, o gene *bla<sub>GIM-1</sub>* foi encontrado associado a um integrão de classe 1 localizado num plasmídeo relativamente pequeno de cerca de 45 kb. Este integrão contém ainda dois genes que codificam resistência aos aminoglicosídeos (*aacA4* e *aadA1* e um gene *bla<sub>OXA-2</sub>*).

Muito recentemente, um novo tipo de MBL adquirida (SIM-1) terá sido descrito na Coreia em isolados de *A. baumannii* (Park *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Enzimas da classe C (grupo 1 da classificação de Bush)

Quando produzidas em grandes quantidades, a actividade marginal das  $\beta$ -lactamases AmpC contra os carbapenemos poderá causar modestos aumentos nos MICs (de 2 a 4 vezes). A resistência aos carbapenemos resultante de um nível elevado de produção de AmpC em combinação sinérgica com outros mecanismos de resistência, como diminuição da permeabilidade da membrana exterior ou efluxo, tem sido descrita em *P. aeruginosa* (Zhou *et al.*, 1993) e em raras estirpes de *Enterobacteriaceae* (Bradford *et al.*, 1997).

### 1.4.4 Enzimas da classe D (grupo 2d da classificação de Bush)

Apesar da estabilidade dos carbapenemos à maioria das enzimas da classe D, resistência aos carbapenemos em isolados de *Acinetobacter* tem sido associada repetidamente a enzimas do tipo oxacilinase. Algumas destas oxacilinas, presentes em isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenemos, foram já sequenciadas e confirmadas como pertencentes à classe D de Ambler (Livermore & Woodford, 2000). As carbapenemases do tipo OXA caracterizam-se por apresentarem elevada homologia com as oxacilinas descritas (mas que não hidrolisam o imipenemo) e por hidrolisarem moderadamente o imipenemo. A maioria destas  $\beta$ -lactamases tem sido identificada em isolados clínicos de *A. baumannii*.

Estão incluídas nesta categoria as carbapenemases pertencentes a quatro grupos. O primeiro grupo (também conhecido por "cluster" tipo OXA-23) é constituído pelas oxacilinases OXA-23 (também designada ARI-1), OXA-27 e OXA-49 (número de acesso do GenBank AY288523) que partilham uma homologia de 99%. Este grupo partilha uma identidade aminoacídica de 60% com um segundo grupo (também conhecido por "cluster" tipo OXA-24) de oxacilinases que engloba a OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40. As enzimas deste grupo diferem entre si em pequenas substituições (homologia de 98% entre OXA-24, OXA-25 e OXA-26). A  $\beta$ -lactamase OXA-51, com uma homologia inferior a 63% com os dois "clusters" descritos anteriormente, foi recentemente identificada em isolados de *A. baumannii* na Argentina e constituirá um terceiro grupo de oxacilinases (Brown *et al.*, 2005) com actividade carbapenemásica. Sete novas  $\beta$ -lactamases da classe D (OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70 e OXA-71), apresentando cerca de 98% de homologia com a OXA-51, foram identificadas em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemos (Brown & Amyes, 2005) provenientes de diferentes países.

A enzima, recentemente caracterizada, OXA-58 (Héritier *et al.*, 2005a; Poirel *et al.*, 2005), pertencerá ao quarto grupo. Esta  $\beta$ -lactamase está pouco relacionada com as outras oxacilinases, partilhando apenas 48 e 43% de homologia com a OXA-23 e OXA-24, respectivamente, e o gene que a codifica encontra-se localizado num plasmídeo (Poirel *et al.*, 2005).

A carbapenemase OXA-23 foi identificada numa estirpe clínica de *A. baumannii* isolada na Escócia, em 1985 (Donald *et al.*, 2000), tendo-lhe sido inicialmente atribuída a designação ARI-1<sup>6</sup> (Paton *et al.*, 1993). Recentemente foi proposta a designação de OXA-23 para esta enzima após verificação da sua capacidade hidrolítica sobre a oxacilina e análise da sua sequência nucleotídica (Donald *et al.*, 2000). A OXA-24 foi identificada numa estirpe de *A. baumannii* em 1997, em Madrid (Bou *et al.*, 2000b) e as  $\beta$ -lactamases OXA-25, OXA-26 e OXA-27 foram encontradas em estirpes de *A. baumannii* provenientes de Espanha, Bélgica e Singapura, respectivamente (Afzal-Shah *et al.*, 2001). A enzima OXA-40, foi descrita numa estirpe de *A. baumannii* isolada de um doente transferido de um hospital em Portugal directamente para França (Héritier *et al.*, 2003) e curiosamente também

<sup>6</sup>*Acinetobacter Resistant Imipenem*

## 1.5. ORIGEM E DISSEMINAÇÃO DAS METALO- $\beta$ -LACTAMASES: UNIDADES DE CAPTURA GENÉTICA

---

em isolados de *A. baumannii* provenientes de Bilbao (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002).

### 1.5 Origem e disseminação das metalo- $\beta$ -lactamases: unidades de captura genética

A emergência de bacilos de Gram-negativo que expressam resistência a múltiplos agentes antimicrobianos constitui um problema de grande actualidade e importância em saúde pública, não só pelo facto de criarem dificuldades no tratamento efectivo das infecções, mas também pelo facto de microrganismos que não são considerados agentes habituais de doença, poderem constituir reservatórios de genes de resistência. A transferência horizontal de genes entre bactérias tem sido amplamente estudada ao longo dos anos, principalmente no que respeita aos mecanismos (conjugação, transformação e transdução) e veículos utilizados para essa troca genética (Roy, 1999). O desenvolvimento da resistência aos antibióticos conduziu à descoberta de inúmeros elementos genéticos móveis relacionados com a disseminação de genes de resistência, incluindo transposões e plasmídeos conjugativos e, mais recentemente, integrons (sistemas naturais de clonagem e expressão que incorporam *open reading frames* (ORFs) e as convertem em genes funcionais (Rowe-Magnus & Mazel, 2001).

Na maior parte dos casos, os genes que conferem resistência aos antibióticos estão localizados em estruturas genéticas móveis, os plasmídeos e transposões (Jacoby & Archer, 1991). A aquisição de novo DNA através de plasmídeos constitui um mecanismo importante de resistência adquirida. Os plasmídeos representam um papel importante na evolução bacteriana, permitindo simultaneamente uma rápida adaptação da bactéria a diferentes condições ambientais, a amplificação de determinados genes importantes num contexto de resposta a factores de stresse, apresentando ainda a capacidade de transferência.

Os transposões são sequências de DNA em cadeia dupla, capazes de promover a sua própria transposição de um local genético para outro. Permitem a translocação de genes de resistência de um plasmídeo para outro, de um plasmídeo para o cromossoma bacteriano ou, ainda, do cromossoma para um plasmídeo (Davies, 1993; Robert-Dernuet, 1995; Trieu-Cuot & Poyart, 1998), aumentando desta forma o potencial para a disseminação dos genes de resistência.

Grande parte da disseminação de genes de resistência em bacilos de Gram-negativo relaciona-se com a presença de integrões. O conceito de integrão teve origem em meados dos anos 80, aquando do estudo molecular de alguns genes de resistência, que revelou a existência de uma sequência comum na região 5' contendo um promotor e um gene codificador de uma integrase, similar às descritas em bacteriófagos. Assim, um integrão pode ser considerado um sistema específico de integração e excisão para a captura, mobilização e expressão de cassetes de genes que geralmente codificam para a resistência a vários antibióticos (incluindo  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim e estreptomicina). As cassetes de genes são elementos móveis contendo um gene de resistência seguido de uma curta sequência de nucleótidos, que funciona como um local de recombinação, denominado "elemento de 59 pares de bases" (59-be). Embora a estrutura deste 59-be varie em sequência nucleotídica e em tamanho em diferentes cassetes, encontra-se limitada, à direita, pelo motivo GTTRRRY (R, purina e Y, pirimidina), também conhecido por *core site*, e à esquerda pelo motivo RYYAAC (*inverse core site*). Geralmente, cada cassette contém apenas um gene, no entanto, em alguns casos poderão surgir cassetes fundidas. Este facto foi já verificado e envolvia um gene codificador de uma MBL e um gene *aacA4*, que codifica resistência a canamicina, neomicina, amicacina, e estreptomicina.

De uma forma geral, e na sua forma mais simples, os integrões são constituídos, no segmento conservado 5'CS, por três elementos necessários à captura e expressão de cassetes de genes: o gene que codifica para a integrase (*intI*), um local de recombinação (*attI*) e um promotor (Pant) responsável pela expressão das cassetes de genes integradas. Por vezes, contêm um segundo promotor, mais forte, (P2). A expressão dos genes de resistência é influenciada pela posição da cassette no integrão, sendo o nível de resistência tanto maior quanto mais próximo a cassette se encontrar do promotor. O segmento 3' CS é menos definido, mas a maioria dos integrões de class 1 apresenta neste local o gene *qacE $\Delta$ 1*, que confere resistência a compostos de amónio quaternário, o gene *sulI*, que codifica resistência às sulfonamidas, e duas *open reading frames*, *orf5* e *orf6*, que codificam proteínas de função desconhecida (Bennett, 1999). As cassetes são inseridas no local *attI*, um processo que envolve a recombinação, mediada pela *intI*, entre o local *attI* do integrão e o 59-be (também designado por local *attC*) da cassette. Os fenómenos de excisão como de integração de cassetes, mediados pela *intI*, foram

## 1.5. ORIGEM E DISSEMINAÇÃO DAS METALO- $\beta$ -LACTAMASES: UNIDADES DE CAPTURA GENÉTICA

---

já demonstrados experimentalmente.

Foram já identificadas quatro classes de integrões, cada qual apresentando um gene *intI* e um local *attI* específicos. Das várias classes de integrões descritas, a mais frequente em isolados clínicos é a classe 1, embora tenha já sido detectado um integrão de classe 2 em *Acinetobacter* spp. e de classe 3 associado a uma MBL.

Os genes que codificam para as MBLs do tipo IMP, VIM e GIM-1 encontram-se inseridos como cassetes em integrões de classe 1, tendo também sido encontrados associados a integrões de classe 3 (caso dos genes *bla<sub>IMP</sub>*).

Embora as cassetes de genes possam movimentar-se livremente entre integrões distintos, não conseguem mover-se de um organismo para outro, necessitando por isso da intervenção de outros elementos genéticos móveis como plasmídeos conjugativos e transposições que sirvam de veículos para a transmissão de material genético intra- e inter-espécies (Bennett, 1999). A maioria dos genes das MBL encontra-se em plasmídeos de cerca de 120 e 180 kb, com excepção de gene *bla<sub>VIM-7</sub>* que se localiza num plasmídeo conjugativo de 24 kb (Toleman *et al.*, 2004).

O contexto genético das MBLs representa não só uma medida da sua plasticidade mas permite também especulações sobre a sua disseminação a nível internacional. Em 2003, Toleman *et al.* (2003) descrevem a associação do gene *bla<sub>IMP-13</sub>* e seu integrão a um transposão tipo Tn5051, num isolado de *P. aeruginosa* em Itália, e afirmam que o integrão contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, observado num isolado de *P. aeruginosa* da Polónia, apresenta localização semelhante. Este facto sugere que o transposão, pela capacidade de mobilização, será responsável pela disseminação de integrões de classe 1 contendo genes que codificam MBLs. Recentemente, Yatsuyanagi *et al.* (2004a) fazem o mesmo tipo de especulação, considerando que alguns integrões contendo a *bla<sub>VIM-2</sub>*, em isolados japoneses, estarão também embebidos em transposições.

O gene *bla<sub>SPM-1</sub>* não se encontra associado nem a integrões nem a transposições, apresentando um contexto genético bastante peculiar. Encontra-se localizado adjacente a genes relacionados com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fazendo parte de uma ilha de patogenicidade e de um plasmídeo (Toleman *et al.*, 2002). Estudos mais recentes com os isolados de *P. aeruginosa* produtores da MBL SPM-1, provenientes do Brasil, demonstraram a existência,

imediatamente antes do gene *bla<sub>SPM-1</sub>*, de uma região CR4 (*common region*) que determinados autores consideraram poder estar relacionada com a mobilização e expressão do gene (Poirel *et al.*, 2004).

As taxas de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos observadas na Ásia, Europa e América Latina estão a atingir níveis preocupantes e a reduzir as opções terapêuticas. Por exemplo, o primeiro isolado caracterizado de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 era resistente a todos os antibióticos excepto à polimixina B e a doente (uma menina de quatro anos de idade) acabou por sucumbir à infecção (Toleman *et al.*, 2002). Recentemente, tem sido possível assistir a um aumento crescente e preocupante de relatos de isolados resistentes aos carbapenemos, produtores de MBLs. Tome-se a título de exemplo a situação observada na Coreia, onde 11,4% de *P. aeruginosa* e 14,2% de *A. baumannii* resistentes ao imipenemo produzem metalo-enzimas (Lee *et al.*, 2003). Num estudo sobre prevalência de isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBLs provenientes de um hospital de São Paulo (Brasil), verificou-se que 44,8% dos isolados apresentava resistência ao imipenemo e que a incidência de estirpes produtoras de MBLs se aproxima de 20% (com predomínio de SPM-1) (Sader *et al.*, 2005b).

Embora a primeira descrição do gene *bla<sub>IM-2</sub>* tenha sido feita por Poirel *et al.* (2000b) em *P. aeruginosa*, num isolado de 1996, o registo mais antigo deste gene relaciona-se com isolados portugueses de *P. aeruginosa* obtidos de doentes hospitalizados no Hospital Vale do Sousa em 1995 (Cardoso *et al.*, 2002). Desde então, isolados clínicos com o gene *bla<sub>IM-2</sub>* têm surgido em muitos outros países, nomeadamente França (Poirel *et al.*, 2001a, 2000a), Itália (Pallecchi *et al.*, 2001), Grécia (Mavroidi *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2003; Giakkoupi *et al.*, 2003a), Espanha (Prats *et al.*, 2002), Polónia (Walsh *et al.*, 2003), Croácia (Sardelic *et al.*, 2003), e Alemanha (Henrichfreise *et al.*, 2005) tornando-se a metalo-enzima dominante na Europa. Fora deste continente, foi já encontrada também na Venezuela e Chile (Mendes *et al.*, 2004a), Coreia (Yum *et al.*, 2002b; Lee *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2003), Japão (Shibata *et al.*, 2003; Yatsuyanagi *et al.*, 2004a), Taiwan (Yan *et al.*, 2002), Arábia Saudita (Guerin *et al.*, 2005) e Estados Unidos (Lolans *et al.*, 2005).

Permanece, contudo, desconhecida a origem das metalo-enzimas adquiridas com importância clínica, nomeadamente por não terem sido efectuados estudos alargados de pesquisa em isolados provenientes de ambientes extra hospitalares.

## 1.6. OBJECTIVOS

---

As descrições destas enzimas têm sido invariavelmente relacionadas com isolados hospitalares, não se conhecendo a sua prevalência noutros nichos ecológicos.

A caracterização de isolados multi-resistentes produtores de enzimas com grandes implicações terapêuticas, pela identificação de clones epidémicos e/ou caracterização de unidades de captura genética facilitadoras da acumulação, transferência e expressão de múltiplos genes, torna-se fulcral para um efectivo controlo da infecção.

## 1.6 Objectivos

Considerando o papel relevante que a resistência aos carbapenemos, verificada em bacilos de Gram-negativo, bem como a contribuição de enzimas capazes de hidrolisar este grupo de antibióticos (carbapenemases) com relevância clínica, tem vindo a assumir nos últimos anos, tornou-se importante realizar um estudo que avaliasse em isolados portugueses, provenientes de distintos nichos ecológicos, a prevalência, origem e sentido de disseminação das carbapenemases.

Contrariamente à maioria dos estudos efectuados até à data, que constituem, no entanto, uma importante base de conhecimento sobre aspectos fundamentais das resistências de estirpes bacterianas aos carbapenemos, pretendeu-se, neste trabalho, alargar o âmbito metodológico a um conjunto de ecossistemas, que apresentam inúmeras sobreposições, formando um contínuo. Para tal, foram importados, no capítulo metodológico e de análise dos resultados, conceitos de ecologia aplicada à saúde pública, por forma a permitir uma nova visão, alargada e integradora, de fenómenos que apresentam já consideráveis graus de disseminação através de diferentes nichos ecológicos.

O presente trabalho propõe-se, numa perspectiva integradora e diversificante, contribuir para o conhecimento da ecologia das carbapenemases de relevância clínica ao longo do contínuo hospital-meio ambiente, numa perspectiva epidemiológica e de saúde pública e, paralelamente, promover a caracterização molecular dessas enzimas. Para o efeito utilizaram-se isolados procedentes de:

**Hospitais:** isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenemos de quatro unidades hospitalares nacionais.

**Nichos ecológicos extra-hospitalares:** bacilos de Gram-negativo de humanos saudáveis da comunidade, águas de rios, águas de esgotos hospitalares e animais.

Assim, constituíram objectivos do presente trabalho:

- detectar e caracterizar, do ponto de vista molecular, as carbapenemases de relevância clínica e sua localização genética.
- estudar a possível clonalidade das estirpes produtoras de carbapenemases.
- caracterizar unidades de captura genética facilitadoras da expressão, acumulação e transferência de genes de resistência aos carbapenemos.
- integrar os resultados obtidos, tentando avaliar a origem, o grau e sentido da dispersão dos isolados produtores de carbapenemases, através dos vários ecossistemas amostrados.
- proceder à validação do uso de bactérias produtoras de carbapenemases como marcadores de contaminação por resíduos hospitalares, representando um instrumento válido para a protecção da saúde pública e ambiente.

### 1.7 Lista de trabalhos que integram a tese

A maioria dos resultados obtidos no decurso do presente trabalho foi previamente publicada, ou submetida para publicação, em jornais científicos de índole internacional. Assim, optou-se pela apresentação dos vários trabalhos em formato de artigo, procedendo-se apenas à sua uniformização gráfica, sem alteração dos conteúdos publicados. Em cada capítulo estão apresentados um ou mais trabalhos de acordo com o nicho ecológico a que estão associados e/ou de acordo com o grupo de bactérias estudadas, por forma a tornar mais clara a leitura e compreensão das relações entre os diversos temas abordados.

- **Quinteira S.M., Ferreira, H. & Peixe, L., 2005.** First isolation of *bla<sub>VIM-2</sub>* in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2140-2141.

## 1.7. LISTA DE TRABALHOS QUE INTEGRAM A TESE

---

- **Quinteira S.M.** & Peixe, L. A multi-niche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-2, in *Pseudomonas aeruginosa*, far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Applied and Environmental Microbiology* (Aceite para publicação com minor revisions).
- G. J. da Silva, **S. Quinteira**, E. Bértolo, J. C. Sousa, L. Gallego, A. Duarte, L. Peixe and the Portuguese Resistance Study Group., 2004. Long term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **54**:255-258.
- **Quinteira S.M.** & Peixe, L. Clonal diversity and carbapenemase production in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated in a Portuguese hospital, during a four year period. (*Em preparação*).
- **Quinteira S.M.**, Sousa, J.C. & Peixe, L.. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 451-453.
- **Quinteira S.M.** & Peixe, L., 2005. Multi-layered dissemination processes of *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates (*Submetido para publicação*).

## Capítulo 2

# Epidemiologia de bacilos de Gram negativo, de origem não hospitalar, produtores de carbapenemases

---

Lista de trabalhos que integram este capítulo:

[1] Quinteira, S., Ferreira, H. & Vieira, L., (2005). First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(5): 2140–2141. doi:10.1128/AAC.49.5.2140–2141.2005. [2] Quinteira S. M. & Peixe, L. (*Accite para publicação com pequenas modificações*). A multi-niche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-2, in *Pseudomonas aeruginosa*, far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Applied and Environmental Microbiology*

## 2.1 First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

S. Quinteira<sup>1</sup>, H. Ferreira<sup>2</sup> and L. Peixe<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico da Saúde do Norte-ESSVA, Porto, Portugal; <sup>2</sup>REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal. \*Corresponding author. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

Since the first description of VIM-2, in France, in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate (Poirel *et al.*, 2000b), this enzyme has been detected in clinical *Pseudomonas* isolates in several countries (Nordmann & Poirel, 2002), thus highlighting the need for a detailed knowledge of its spreading dynamics. In Portugal, since the first clinical isolate of *bla*<sub>VIM-2</sub>-producing *P. aeruginosa*, collected in 1995 (Cardoso *et al.*, 2002), several carbapenemase producers have been recurrently observed in hospitals from the northern and central regions (Quinteira *et al.*, 2003).

Concerns in the scientific community rapidly grew when, besides the rapid boost in the increase of this enzyme's geographical distribution area, VIM-2 started to be found in other species than *P. aeruginosa*, such as *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* (Yan *et al.*, 2001b), and some *Enterobacteriaceae* (Galani *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; Yum *et al.*, 2002b). Nevertheless, all these isolates were found in the hospital setting, possibly suggesting a certain degree of confinement within this ecological niche. In this study we report the first environmentally isolated *Pseudomonas pseudoalcaligenes* carrying a metallo- $\beta$ -lactamase (MBL).

*P. pseudoalcaligenes* E60 was recovered from a hospital wastewater-receiving urban sewage system, as a result of regular screening for MBL producers from several sources. Sampling procedure consisted of plating 100- $\mu$ l aliquots of wastewater on MacConkey agar supplemented with imipenem (2  $\mu$ g/ml). Samples were collected upstream and downstream from the point where hospital wastewaters were discharged in the sampled sewage. The identification of isolate E60 was based on the results of 16S rRNA sequencing. The MICs of  $\beta$ -lactams were deter-

mined by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden). The strain was resistant to carbapenems (MICs for imipenem and meropenem were  $>32 \mu\text{g/ml}$ ) but was still susceptible to aztreonam (MIC,  $2 \mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime (MIC,  $8 \mu\text{g/ml}$ ), cefepime (MIC,  $4 \mu\text{g/ml}$ ), piperacillin (MIC,  $8 \mu\text{g/ml}$ ), and piperacillin + tazobactam (MIC,  $8 \mu\text{g/ml}$ ). It was also susceptible to all four tested aminoglycosides (tobramycin, amikacin, gentamicin, and netilmicin) and to ciprofloxacin, tested by the disk diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). The strain was positive by an MBL production screening test (Cardoso *et al.*, 2002), and a multiplex PCR assay designed to amplify both the *bla<sub>IM</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* genes (Cardoso *et al.*, 2002; Senda *et al.*, 1996a) was performed. Sequencing confirmed that this strain possessed *bla<sub>IM-2</sub>*.

The metallo- $\beta$ -lactamase determinant was not transferred to rifampin-resistant *P. aeruginosa* strain PAO or rifampin-resistant *Escherichia coli* strain K802N in mating experiments in solid media (Quinteira *et al.*, 2005b). These results suggested the chromosomal location of *bla<sub>IM</sub>* which was later confirmed by total DNA digest with I-CeuI enzyme, its separation by pulsed-field gel electrophoresis, and hybridization with *bla<sub>IM-2</sub>* and rRNA probes, as described previously (Quinteira *et al.*, 2005b). Three chromosomal bands were visualized after I-CeuI digestion (ca. 430, 840, and 1,080 kb), and the *bla<sub>IM-2</sub>* probe hybridized with the 430- and 840-kb fragments of strain E60, indicating the chromosomal location of this gene (data not shown).

PCR amplification and sequencing with primers for the 5' and 3' conserved segments from class 1 integrons as previously described (Quinteira *et al.*, 2005b) revealed an integron almost identical to In56 previously reported in a *P. aeruginosa* clinical isolate (Poirel *et al.*, 2000b). The only differences with In56 were those observed in the promoter region. The Pc promoter found in this *P. pseudoalcaligenes* E60 integron is a strong promoter ( $-35$  [TTGACA];  $-10$  [TAAACT]) (Collis & Hall, 1995), a different configuration compared to In56 (with a weak-type promoter).

This is the first isolation of an environmental *P. pseudoalcaligenes* strain producing MBL. Like other species of the genus *Pseudomonas* (e.g., *P. putida* and *P. stutzeri*), *P. pseudoalcaligenes* is widely distributed in soil and aquatic habitats and rarely involved in clinical infections. It is important to note that no carbapenemase producers were detected upstream of the hospital wastewater discharge site

## 2.1. FIRST ISOLATION OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN AN ENVIRONMENTAL ISOLATE OF *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

---

and there were no previous recordings of *Pseudomonas* species, other than *P. aeruginosa*, infections in the hospital. Nevertheless, *P. aeruginosa* clinical isolates with VIM-2 were already detected in that same hospital (S. Quinteira, personal observation).

Our findings suggest that the ongoing spread of *bla<sub>VIM-2</sub>* is currently occurring simultaneously in several dimensions, since it can now be found in distinct geographical locations, in several bacterial species, and in different environments. These enzymes seem not to be restricted to the hospital setting, a fact that emphasizes the importance of surveying environmental strains that might act as a source and/or reservoir of resistance genes with clinical relevance.

**Nucleotide sequence accession number.** The GenBank accession no. of the nucleotide sequence reported here is AY685199.

### 2.1.1 Acknowledgements

We thank Nuno Monteiro for critical review of the manuscript. Sandra Quinteira is a Ph.D. student from Programa PRODEP.

### 2.1.2 References

CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.

COLLIS, C. M. & HALL, R. M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 155–162.

GALANI, I., SOULI, M., CHRYSSOULI, Z., KATSALA, D. & GIAMARELOU, H., 2004. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing both metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase IBC-1. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 757–760.

JEONG, S. H., LEE, K., CHONG, Y., YUM, J. H., LEE, S. H., CHOI, H. J., KIM, J. M., PARK, K. H., HAN, B. H., LEE, S. W. & JEONG, T. S., 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 397–400.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement M100-S12. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

NORDMANN, P. & POIREL, L., 2002. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* **8**: 321–331.

POIREL, L., NAAS, T., NICOLAS, D., COLLET, L., BELLAIS, S., CAVALLLO, J.-D. & NORDMANN, P., 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 891–897.

QUINTEIRA, S., CARDOSO, O., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2003. Characterization of integrons carrying VIM-2 in *Pseudomonas* spp. from Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* **9** (Suppl 1): 55.

QUINTEIRA, S., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 451–453.

SENDA, K., HAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA., M., 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.

## 2.1. FIRST ISOLATION OF $BLA_{VIM-2}$ IN AN ENVIRONMENTAL ISOLATE OF *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

---

YAN, J. J., HSUEH, P.-R., KO, W.-C., LUH, K.-T., TSAI, S.-H., WU, H.-M. & WU, J.-J., 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2224–2228.

YUM, J., YONG, D., LEE, K., KIM, H.-S. & CHONG., Y., 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **42**: 217–219.

## 2.2 A multi-niche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-2, in *Pseudomonas aeruginosa*, far from the hospital setting: an ongoing dispersion process?

S. Quinteira<sup>1</sup> and L. Peixe<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico da Saúde do Norte-ESSVA, Porto, Portugal; <sup>2</sup>REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal. \*Corresponding author. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

### 2.2.1 Abstract

A screening study of the presence of metallo- $\beta$ -lactamases (IMP and VIM types, and SPM-1) in isolates from different non-hospital sources was conducted revealing the presence of *bla*<sub>VIM-2</sub>, associated to In58 class 1 integron, in two unrelated *Pseudomonas aeruginosa* from the aquatic habitat. Gathered results suggest the hospital setting as a possible origin for this *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integron.

### 2.2.2 Note

Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) of IMP and VIM type are emerging worldwide as a source of acquired carbapenem resistance in gram-negative bacteria compromising the efficacy of several  $\beta$ -lactam antibiotics. Recently, even though restricted to Brazil and Germany, new MBLs, SPM-1 and GIM-1, respectively, have also emerged (Walsh *et al.*, 2005). During the last few years, several MBL-producing gram-negative bacteria have been reported in Portugal (Cardoso *et al.*, 2002; Conceição *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2002; Quinteira *et al.*, 2005b), namely IMP-5 [only observed in *Acinetobacter baumannii* (Da Silva *et al.*, 2002) and *Pseudomonas aeruginosa* (A. Duarte, A. Brizio, F. Grosso, T. Conceição, and G. Da Silva, Abstr. 43rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C2-

## 2.2. A MULTI-NICHE SCREENING REVEALS THE CLINICALLY RELEVANT METALLO- $\beta$ -LACTAMASE, VIM-2, IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, FAR FROM THE HOSPITAL SETTING: AN ONGOING DISPERSION PROCESS?

---

2024, 2003)] and VIM-2 [the most common MBL, present in several isolates of *P. aeruginosa* (Cardoso *et al.*, 2002; Quinteira *et al.*, 2005b) and recently in *Klebsiella oxytoca* (Conceição *et al.*, 2005)]. Interestingly, these isolates were almost exclusively reported within the hospital setting. Recently, a *bla*<sub>VIM-2</sub>-producing *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was isolated outside hospital boundaries, in a hospital sewage sample (Quinteira *et al.*, 2005a), thus indicating the possibility of MBLs spreading into new, previously unreported, niches. The notion of an apparent confinement of these clinically relevant enzymes in the hospital setting may be the result of a strongly biased sampling effort. The role of non-clinical niches as a reservoir of acquired MBL genes is still poorly established. The previously mentioned VIM-2 enzyme collected in the aquatic environment (Quinteira *et al.*, 2005a), the available information that points out the fact that animals constitute important antimicrobial-resistance gene reservoirs, together with the notion that some  $\beta$ -lactamases with an environmental origin are currently spreading within healthy humans and most are probably imported into the hospital setting (Pitout *et al.*, 2005), can be viewed as relevant examples of distinct reservoirs and/or sources of resistance genes.

Acquired MBL genes are usually associated to gene cassettes inserted in integrons found in the chromosome or in plasmids (Pallecchi *et al.*, 2001). Diversity of integron structures is observed in different countries and, in Portugal, although several integrons have been associated to the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene, the In58 is the most commonly found (L. Peixe, personal observation). The recently discovered association of integrons carrying these enzymes to transposon-like structures (Toleman *et al.*, 2003) may account for their variable location and spread.

In this study, the presence of acquired MBLs in Gram-negative bacilli was evaluated among non-hospital sources, within Northern Portugal, between 2001 and 2005, in order to obtain epidemiological data on the scale of their dissemination. Twenty four samples from healthy human volunteer faeces and 83 from ambulatory patients, 30 from poultry skin (chosen among the main brands sold in Portugal), 4 from swine faeces, 13 from rivers and 29 from hospital wastewater-receiving urban sewage (14 upstream and 15 downstream of the hospital wastewater discharge site) were collected and used in the screening of MBL production. Sample aliquots were plated, in MacConkey agar and/or Pyocyanosel agar (Oxoid) supplemented with imipenem (2  $\mu$ g/ml) (Merck Sharpe & Dohme Ltd)

and colonies with different morphology were collected. Species identification was performed with the API 32GN (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Imipenem susceptibility was evaluated by the disk diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics, in VIM-2-producers, were determined by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden) and the susceptibility to aminoglycosides and ciprofloxacin was determined, for particular strains, by the disk diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Isolates that have grown in MacConkey agar and/or Pyocyanosel agar supplemented with imipenem were evaluated for MBL production by a disk-diffusion test. Briefly, individual colonies from fresh cultures were suspended in saline water to a turbidity of a 0.5 McFarland standard. The inoculum was transferred to Mueller-Hinton agar plates using cotton swabs and imipenem disks with and without EDTA (750  $\mu$ g) were applied. Plates were incubated overnight at 37 °C. An increase (> 2mm) in the inhibition zone of imipenem disk with EDTA was used as a preliminary criteria for detection of metallo- $\beta$  -lactamase production. A dot blot hybridization was also performed in all collected isolates in order to detect the presence of MBL genes. Chromosomal DNA was transferred to a Hybond N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill) and hybridized to *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> specific probes generated by PCR. Labelling and detection were performed with the ECL Random Prime labelling and detection system (Amersham Life Science) following the manufacturer's instructions. A multiplex PCR assay with *bla*<sub>VIM</sub>- and *bla*<sub>IMP</sub>-specific primers was also used (Cardoso *et al.*, 2002; Senda *et al.*, 1996a). Characterization of the MBL genetic context was performed by PCR using class I integrons specific primers (Lévesque *et al.*, 1995) and sequencing. Clonal relatedness among isolates was assessed by PFGE using SpeI. Additional comparisons were undertaken using also a Portuguese VIM-2-producing *P. aeruginosa* hospital strains collection. Total DNA digest with I-CeuI enzyme, its separation by PFGE, and hybridization with *bla*<sub>VIM-2</sub> and rRNA probes, as described previously (Quinteira *et al.*, 2005b), was performed in order to assess the genetic location of the *bla*<sub>VIM-2</sub>.

Two hundred and seventy three Gram-negative bacilli (21 lactose-fermenters and 252 non lactose-fermenters) were isolated from the different sources used in the multidimensional screening for MBLs. All poultry isolates (n=56) showed

## 2.2. A MULTI-NICHE SCREENING REVEALS THE CLINICALLY RELEVANT METALLO- $\beta$ -LACTAMASE, VIM-2, IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, FAR FROM THE HOSPITAL SETTING: AN ONGOING DISPERSION PROCESS?

---

imipenem susceptibility. Decreased susceptibility (isolates presenting resistance and intermediate susceptibility) to imipenem was observed in 74 isolates from sewage (8 from urban sewage and 17 from receiving hospital wastewater sewage), rivers (n=17), swine faeces (n=12), ambulatory patients (n=10), and healthy volunteer faeces (n=10). From these isolates, 56 showed MBL-positive bioassay (24 from sewage, 17 from rivers, 7 from swine faeces, 7 from ambulatory patients, and 1 from a healthy human). *bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>SPM-1</sub>* genes were not detected in any of these isolates. However, two *P. aeruginosa* isolates [R2 strain collected in a river (the river Sousa) and E58 strain collected in a sewage, downstream from an hospital discharge site (in Porto)] showed a hybridization signal with *bla<sub>IM</sub>* probe, by dot-blot. It is important to stress that these two isolates were collected from geographically distant locations and, therefore, a direct link between the two isolates is improbable. The R2 and E58 strains presented resistance to imipenem (>32  $\mu$ g/ml and 16  $\mu$ g/ml, respectively), cefepime (>32  $\mu$ g/ml), an intermediate susceptibility to ceftazidime (16  $\mu$ g/ml), variable susceptibility to meropenem (8  $\mu$ g/ml and 1  $\mu$ g/ml, respectively), but remained susceptible to piperacillin (16  $\mu$ g/ml), piperacillin-tazobactam (16  $\mu$ g/ml), and aztreonam (4  $\mu$ g/ml). The R2 isolate also showed resistance to ciprofloxacin. The two isolates were also resistant to tobramycin, gentamicin, amikacin, netilmicin, with the corresponding aminoglycoside-modifying enzyme genes located in an integron which contains the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene. Sequencing allowed the identification of this integron as In58. This class 1 integron presents four gene cassettes: an *aacA7* in the first position followed by the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene cassette, an *aacC1*, and an *aacA4* gene cassette (Poirel *et al.*, 2001a). I-CeuI technique results revealed a chromosomal location of the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene (data not shown). PFGE of the two environmental *P. aeruginosa* VIM-2-producers resulted in distinct genomic fingerprints (Figure 2.1). Nevertheless, a difference in five bands was observed between the R2 strain and a VIM-2-producing *P. aeruginosa* isolate (IPO-3) from an hospital located in Porto (Figure 2.1) suggesting a possible genetic relatedness (Tenover *et al.*, 1995), even though no physical connection exists between the river and hospital from where these strains were isolated.

It seems now clear that MBL resistance genes have already crossed the hospital boundaries. Interestingly, both described isolates were detected in the aquatic environment, thus, once again, putting into evidence the significant role of this

EPIDEMIOLOGIA DE BACILOS DE GRAM NEGATIVO, DE ORIGEM NÃO  
HOSPITALAR, PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

---

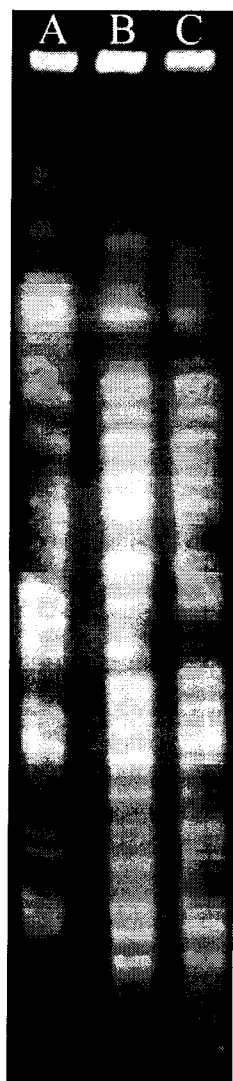


Figure 2.1: PFGE patterns, of SpeI-digested genomic DNA, of *bla*<sub>VIM-2</sub>-positive *P. aeruginosa* isolates. A, isolate E58; B, IPO-3 hospital isolate; C, isolate R2.

## 2.2. A MULTI-NICHE SCREENING REVEALS THE CLINICALLY RELEVANT METALLO- $\beta$ -LACTAMASE, VIM-2, IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, FAR FROM THE HOSPITAL SETTING: AN ONGOING DISPERSION PROCESS?

---

ecological niche as a reservoir for carbapenemase genes (Aubron *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2005a). The active role of the "sewage habitat" has to be considered as a gathering place for many bacterial species with distinct resistance profiles (Lévesque *et al.*, 1995) and its high potential for bacterial dissemination downstream into rivers (Novais *et al.*, 2005) and coastal waters. Since sewage treatment plants are currently inefficient in the selective elimination of bacteria (Vilanova *et al.*, 2004), and *Pseudomonas* spp. are ubiquitous and extremely adaptable, there seems to be few obstacles to the persistence and transferability of resistance genes, such as *bla*<sub>VIM-2</sub>.

A closer look into the collected evidence might also help pinpoint the origin of VIM-2 in our environmental isolates: (i) both isolates (R2 and E58) presented the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene within the same genetic structure, In58. This integron confers resistance to aminoglycosides and imipenem, antibiotics commonly (and for imipenem only) used in the hospital treatment of *P. aeruginosa* infections, and is the most prevalent class 1 integron in Portuguese hospital isolates (L. Peixe, personal observation), here described for the first time outside the clinical setting, (ii) In58 was recovered simultaneously in a hospital unit, located in Porto, (L. Peixe, personal observation) and now in the sewage, downstream from its discharge site, in two unrelated *P. aeruginosa* isolates, (iii) we can not discharge the possibility of contamination with urban wastewaters containing hospital sewage from the location in the vicinity of the river from where the isolate R2 was obtained (iv) the river isolate seems to be clonally related to a hospital isolate also carrying In58, (v) VIM-2 was not observed, in this study, in other ecological niches such as animals, healthy humans, and ambulatory patients. Thus, it seems logical to consider that hospital acts as a centre of dissemination of the previously clinically restricted *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integron, In58.

Disturbingly, the results emerging from this study show that, even if in very low frequencies, *bla*<sub>VIM-2</sub> genes loose in the environment, namely in sewage and rivers, may undermine the effectiveness of carbapenems, largely depending on the eradication or confinement of resistant bacteria.

### 2.2.3 Acknowledgments

We would like to thank to Maria Isaura Sousa and Helena Ferreira for kindly providing ambulatory strains and some of the aquatic samples, respectively, and to Cristina Réu for technical assistance. We are also grateful to Nuno Monteiro for helpful discussions and critical review of the manuscript. Sandra Quinteira is a PhD student from Programa PRODEP.

### 2.2.4 References

AUBRON, C., POIREL, L., ASH, R. & NORDMANN, P., 2005. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. Rivers. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 260–264.

CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.

CONCEIÇÃO, T., BRÍZIO, A., DUARTE, A. & BARROS, R., 2005. First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 476.

DA SILVA, G. J. D., CORREIA, M., VITAL, C., RIBEIRO, G., SOUSA, J. C., LEITÃO, R., PEIXE, L. & DUARTE, A., 2002. Molecular characterization of *bla*<sub>IMP-5</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 33–39.

LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C. & ROY, P. H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 185–191.

## 2.2. A MULTI-NICHE SCREENING REVEALS THE CLINICALLY RELEVANT METALLO- $\beta$ -LACTAMASE, VIM-2, IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, FAR FROM THE HOSPITAL SETTING: AN ONGOING DISPERSION PROCESS?

---

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement M100-S12. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

NOVAIS, C., COQUE, T. M., FERREIRA, H., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant *Enterococci* from hospital sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3364–3368.

PALLECCHI, L., RICCIO, M., DOCQUIER, J., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G., 2001. Molecular heterogeneity of *bla*(VIM-2)-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters* **195**: 145–50.

PITOUT, J. D., NORDMANN, P., LAUPLAND, K. B. & POIREL, L., 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 52–59.

POIREL, L., LAMBERT, T., TÜRKÖGLÜ, S., RONCO, E., GAILLARD, J.-L. & NORDMANN, P., 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 546–552.

QUINTEIRA, S., FERREIRA, H. & PEIXE, L., 2005a. First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2140–2141.

QUINTEIRA, S. & PEIXE, L., Submitted for publication. Multi-layered dissemination processes of *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Submitted for publication.

EPIDEMIOLOGIA DE BACILOS DE GRAM NEGATIVO, DE ORIGEM NÃO  
HOSPITALAR, PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

---

QUINTEIRA, S., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005b. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 451–453.

SENDA, K., HARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA., M., 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D. & SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233–2239.

TOLEMAN, M. A., BIEDENBACH, D., BENNETT, D., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2003. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>IMP-13</sub>*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 583–590.

VILANOVA, X., MANERO, A., CERDÀ-CUÉLLAR, M. & BLANCH, A. R., 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 279–288.

WALSH, T., TOLEMAN, M., POIREL, L. & NORDMANN, P., 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* **18**: 306–325.

2.2. A MULTI-NICHE SCREENING REVEALS THE CLINICALLY  
RELEVANT METALLO- $\beta$ -LACTAMASE, VIM-2, IN *PSEUDOMONAS*  
*AERUGINOSA*, FAR FROM THE HOSPITAL SETTING: AN ONGOING  
DISPERSION PROCESS?

---

## Capítulo 3

# Epidemiologia de *Acinetobacter* spp., de origem hospitalar, resistentes aos carbapenemos. Detecção e caracterização de carbapenemases. Pesquisa de unidades de captura genética associadas e sua localização

---

Lista de trabalhos que integram este capítulo:

[1] Da Silva, G., S. Quinteira, E. Bértolo, J. C. Sousa, L. Gallego, A. Duarte, L. Peixe & the Portuguese Resistance Study Group (2004). Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 255–258. [2] Quinteira S. M., H. Ramos, J. Amorim & Peixe, L. (*Em preparação*). Clonal diversity and carbapenemase production in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated in a Portuguese hospital, during a four year period.



3.1. LONG-TERM DISSEMINATION OF AN OXA-40  
CARBAPENEMASE-PRODUCING *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLONE  
IN THE IBERIAN PENINSULA

---

**3.1 Long-term dissemination of an OXA-40  
carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*  
clone in the Iberian Peninsula**

G. J. Da Silva<sup>1\*</sup>, S. Quinteira<sup>2,3</sup>, E. Bértolo<sup>4</sup>, J. C. Sousa<sup>2</sup>, L. Gallego<sup>5</sup>, A. Duarte<sup>4</sup> and L. Peixe<sup>2</sup> on behalf of the Portuguese Resistance Study Group<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra and Centro de Estudos Farmacêuticos, Couraça dos Apóstolos, 51 r/c Esq., 3000-432 Coimbra; <sup>2</sup>Faculdade da Farmácia, Universidade do Porto; <sup>3</sup>Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, VN Famalicão; <sup>4</sup>Faculdade da Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; <sup>5</sup>Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Medicina, Universidade do País Basco, Bilbao, Spain. <sup>†</sup>Members of the Portuguese Resistance Study Group are listed in the Acknowledgements. \* Corresponding author. E-mail: gjsilva@ci.uc.pt.

**3.1.1 Synopsis**

**Objective:** The main objectives of this study were to assess the clonal relatedness of *Acinetobacter baumannii* carbapenem-resistant isolates recovered from the Iberian Peninsula and to investigate the production of carbapenemases.

**Methods:** One hundred and sixty-two imipenem-resistant *A. baumannii* isolates were collected from 1998 to 2003 in three Portuguese university hospitals. An imipenem-resistant isolate (988FFP strain) recovered in 1995 from a smaller hospital unit, was also included, as well as an OXA-40-producing *A. baumannii* Spanish strain (SM28). Susceptibility tests were carried out by disc diffusion and Etest methods. DNA fingerprints were obtained by PFGE of *ApaI*-digested chromosomal DNA. Carbapenemase activity was determined by a bioassay and spectrophotometry. The detection of the *bla*<sub>OXA-40</sub> gene was conducted through PCR analysis, cloning and nucleotide sequencing.

**Results:** All the isolates presented a similar multi-resistance pattern, including imipenem (MIC >32 mg/L). The Iberian isolates showed an identical PFGE pattern with minor band variations, including isolate 988FFP collected in 1995. PCR results revealed a *bla*<sub>OXA-type</sub> gene in 65 isolates and nucleotide sequence

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

analysis revealed the presence of the *bla<sub>OXA-40</sub>* gene in seven representative Portuguese isolates from the various geographically dispersed hospitals.

**Conclusions:** Our results indicate that a multi-resistant epidemic clone of *A. baumannii*, carrying *bla<sub>OXA-40</sub>*, is disseminated in the Iberian Peninsula, persisting in Portugal since 1995.

### 3.1.2 Introduction

Oxacillinases (Ambler class D) with carbapenemase activity, namely OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27 and OXA-40, have been found mainly in *Acinetobacter baumannii* isolates from the UK, Spain, Belgium and Singapore (Donald *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2000b; Afzal-Shah *et al.*, 2001; Lopez-Otsoa *et al.*, 2002).

*A. baumannii* is recognized as an important cause of nosocomial infections mainly observed in intensive care units. Numerous outbreaks of *Acinetobacter* spp. infections have been reported, often associated with the spread of multi-resistant strains (Bou *et al.*, 2000a; Corbella *et al.*, 2000).

Some outbreaks due to imipenem-resistant *A. baumannii* isolates occurred between 1998 and 2003 in various Portuguese hospitals located in distinct cities. These isolates were resistant to most of the alternative antimicrobials. Clonal outbreaks of infection caused by carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* have also been reported in Spain (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002; Bou *et al.*, 2000a; Corbella *et al.*, 2000).

The purposes of this study were to assess the clonal relatedness of *A. baumannii* imipenem resistant isolates collected from Iberian Peninsula hospitals and to investigate the production of carbapenemases.

### 3.1.3 Materials and methods

#### 3.1.3.1 Bacterial isolates

One hundred and sixty-two multi-resistant *A. baumannii* isolates were collected between 1998 and 2003, from different patients hospitalized at intensive care units, surgery and medicine wards in three university teaching hospitals each with

### 3.1. LONG-TERM DISSEMINATION OF AN OXA-40 CARBAPENEMASE-PRODUCING *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLONE IN THE IBERIAN PENINSULA

---

more than 600 beds. One hundred and eight isolates were recovered between October 1998 and September 2000 from Hospital de Santa Maria in Lisboa (HSM). During the period of January 1999 to October 2000, 23 isolates were collected in Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) located in the centre of Portugal. The remaining 31 isolates were collected in Hospital Santo António in Porto (HSA), located in the north, during 2001-2003. A representative strain of the Spanish isolates from Hospital Santa Marina de Bilbao (SM), the SM28 isolate (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002), was included in this study, as well as a strain from the laboratory bacterial collection of Faculdade de Farmácia da Universidade of Porto, *A. baumannii* 988FFP, isolated in 1995 from an inpatient of Hospital Padre Américo (HPAP), a small hospital unit located near Porto. This strain presented an antimicrobial profile identical to the isolates recovered recently.

#### 3.1.3.2 Bacterial identification and susceptibility tests

All isolates were identified by the API 20NE system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and the basic properties of the genus *Acinetobacter*. Genospecies identification was carried out by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) (Grundman *et al.*, 1997).

Susceptibility testing was carried out by the disc diffusion method, according to NCCLS guidelines, using amoxicillin, co-amoxiclav, ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin and polymyxin B discs (Oxoid). MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics were determined by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden), according to the manufacturer's instructions. The following  $\beta$ -lactam antibiotics were used: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid (2:1), piperacillin, piperacillin/tazobactam (4 mg/L), ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid (2 mg/L), ampicillin/sulbactam (2:1), cefoxitin, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, ceftazidime, aztreonam and imipenem. Resistance was defined according to the NCCLS guidelines.

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

### 3.1.3.3 Pulsed-field gel electrophoresis

Genomic DNA patterns were analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Chromosomal DNA was digested with *Apa*I (New England Biolabs, Izasa, Portugal). The restriction fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel in 0.5xTBE buffer, pH 8.0, at 200V and 15°C for 24 h, with pulse time ramp from 5 to 15 s, with a CHEF DRII (Bio-Rad).

### 3.1.3.4 Determination of carbapenemase activity

Detection of carbapenemase activity was carried out in crude extracts by a microbiological assay using imipenem discs (10µg) impregnated with enzymic extracts and EDTA solution. Inactivation of imipenem was shown by growth of the *Escherichia coli* ATCC 25922 strain within the expected inhibition zone. Specific β-lactamase activity was evaluated in extracts by spectrophotometry in the presence of zinc or EDTA solutions, as described elsewhere (Da Silva *et al.*, 2002), using 65FFC strain (IMP-5 producer) and ATCC 19606 *A. baumannii* as controls.

### 3.1.3.5 PCR amplification, cloning and sequencing of *bla*<sub>OXA</sub> gene

The presence of *bla*<sub>OXA</sub> genes was determined using the *bla*<sub>OXA-24</sub> primers (Bou *et al.*, 2000a). The amplification reaction conditions were: an initial denaturation step of 3 min/94°C, followed by 30 cycles of denaturation 1 min/94°C, annealing 1 min/50°C and elongation 2 min/72°C, with a final extension of 8 min/72°C. PCR products were cloned into the pPCR-Script Cam SK(+) vector according to the manufacturer's instructions for the PCR-Script Cam Cloning Kit (Stratagene, Cambridge, UK). *E. coli* XL10-Gold transformants were selected with chloramphenicol (30 mg/L). Nucleotide sequences were determined and compared with published sequences using CLUSTAL W software.

### 3.1. LONG-TERM DISSEMINATION OF AN OXA-40 CARBAPENEMASE-PRODUCING *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLONE IN THE IBERIAN PENINSULA

---

#### 3.1.4 Results

##### 3.1.4.1 Bacterial identification and susceptibility tests

The isolates were classified in the complex *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* and representative isolates from each hospital identified by ARDRA as *Acinetobacter* genospecies 2, known as *A. baumannii*. All the isolates showed an identical  $\beta$ -lactam resistance profile, including resistance to amoxicillin and its association with clavulanic acid, ureidopenicillins and their associations, ceftiofime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, ceftipime, aztreonam (MICs between 128 and  $>256$  mg/L), ampicillin/sulbactam (MIC of 64 mg/L) and high resistance to imipenem (MIC  $>32$  mg/L). Isolates were resistant to ciprofloxacin whereas the susceptibility profile to aminoglycosides was variable.

##### 3.1.4.2 DNA fingerprinting

DNA profiles obtained by PFGE of representative isolates from different Portuguese hospitals, recovered at different times, differed by only one or two bands (Figure 3.1), and are closely related, according to the criteria of Tenover *et al.* (1995). Moreover, the SM28 Spanish strain showed the same overall pattern of Portuguese isolates.

##### 3.1.4.3 Carbapenemase activity

The results of the microbiological assay carried out for 54 isolates suggested the production of a carbapenemase not inhibited by EDTA, except in two HUC isolates (141FFC and 150FFC) and in one HSA isolate that apparently did not hydrolyse imipenem. The specific  $\beta$ -lactamase activity was determined in strain 988FFP and in 141FFC and 150FFC extracts, for confirmation. The 988FFP extract hydrolysed imipenem (5.11 nmol/min per mg of protein) and similar values were obtained when the carbapenemase activity was evaluated in the presence of zinc and EDTA (5.07 and 5.13 nmol/min per mg of protein, respectively), suggesting the production of a serine- $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity. The specific activity values of 141FFC and 150FFC extracts (0.12 and 0.41 nmol/min

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

per mg of protein) were similar to the  $\beta$ -lactamase activity obtained with the imipenem-susceptible *A. baumannii* ATCC 19606.

#### 3.1.4.4 Nucleotide sequence of blaOXA gene

PCR with OXA-24 primers amplified an ~980 bp fragment in 65 isolates tested. Seven isolates, two from each hospital (including 141FFC isolate) and the 988FFP strain were selected for cloning. The nucleotide sequence of the inserts revealed an open reading frame (ORF) of 825 bp, with 100% homology with *bla*<sub>OXA-40</sub>.

#### 3.1.5 Discussion

*A. baumannii* is an emergent nosocomial pathogen, in part due to the capability of acquiring resistance to multiple antimicrobial agents. Clonal outbreaks due to imipenem-resistant strains of *A. baumannii* have been reported in particular hospitals (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Bou *et al.*, 2000a; Corbella *et al.*, 2000).

Since 1998, a high imipenem resistance incidence has been observed among nosocomial *A. baumannii* isolates in Portugal. Therefore, it was our purpose to ascertain if the resistance was due to the dissemination of an imipenem resistance determinant and/or to the spread of one *A. baumannii* clone.

Microbiological and spectrophotometric assays showed that imipenem was hydrolysed by enzymic extracts. An alteration of carbapenemase activity was not observed in the presence of zinc and EDTA, suggesting the production of a non-metallo- $\beta$ -lactamase. OXA Class D carbapenemases have been identified mainly in *A. baumannii* strains collected in Europe (Donald *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2000b; Afzal-Shah *et al.*, 2001; Lopez-Otsoa *et al.*, 2002). OXA-24, OXA-25 and OXA-40  $\beta$ -lactamases have been found in isolates from Spain associated with outbreaks. Héritier *et al.* (2003) have recently characterized biochemically and genetically the OXA-40 carbapenemase in a single *A. baumannii* isolate, recovered from a Portuguese patient who was transferred directly to France. This study shows that *A. baumannii* isolates collected from the three main Portuguese university hospitals between 1998 and 2003 and the 988FFP strain, isolated in 1995, carried the *bla*<sub>OXA-40</sub> gene, just as the Spanish isolate SM28.4 Among the isolates tested, three isolates did not significantly hydrolyse imipenem, although they carried the

### 3.1. LONG-TERM DISSEMINATION OF AN OXA-40 CARBAPENEMASE-PRODUCING *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLONE IN THE IBERIAN PENINSULA

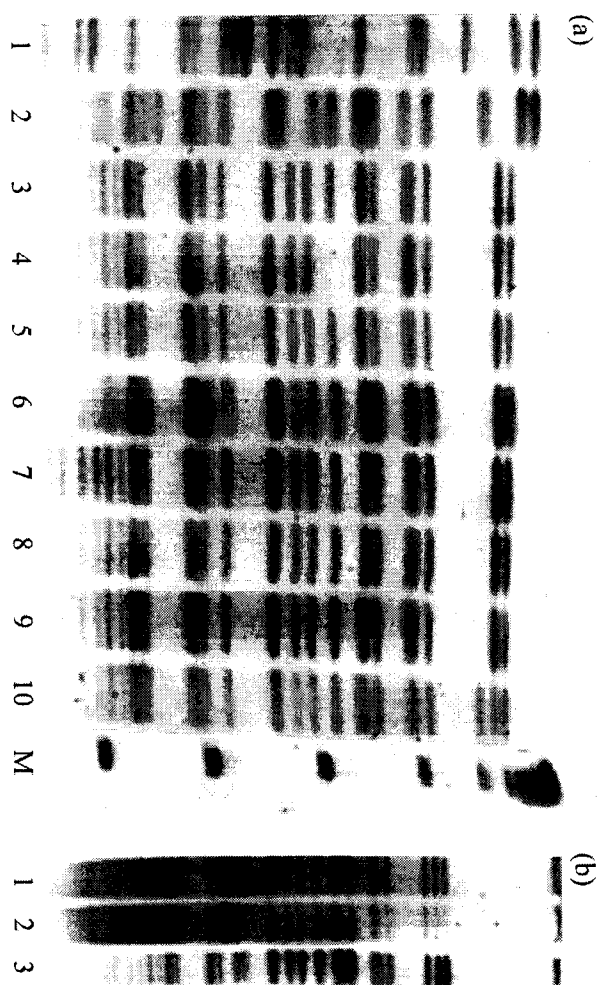


Figure 3.1: PFGE of genomic DNA from representative *A. baumannii* isolates, recovered from different Portuguese university hospitals, after digestion with *Apal* (inverse image). (a) and (b) are from different gels. (a) Lane 1, ATCC19606 strain; lane 2, imipenem-susceptible isolate; lanes 3-5 and 7-9, isolates from HUC (Coimbra), including 141FFc and 150FFC (lanes 3 and 5, respectively); lane 6, isolate from HSA (Porto); lane 10, isolate from HSM (Lisboa); lane M, lambda DNA concatemers. (b) lanes 1 and 2, isolates from HSM; lane 3, isolate SM28.

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

*bla*<sub>OXA-40</sub> gene, as shown by PCR, and in 141FFC strain, confirmed by cloning and sequencing results. The data indicate that detection of *bla*<sub>OXA-40</sub> by PCR does not always correlate with carbapenemase production and may over-report the frequency of OXA carbapenemase producers. Other resistance mechanisms, like reduced permeability of the outer membrane and alteration in PBPs, may also contribute to carbapenem resistance (Bou *et al.*, 2000a).

The clonal relatedness of *A. baumannii* Portuguese isolates and SM28 strain was evaluated by antibiotyping and PFGE. All the isolates presented an identical antibiotic resistance profile, only variable for aminoglycosides, and a very similar *Apal* pattern (Fig. 3.1), differing by no more than three fragments. Such a correspondence of phenotypic and genotypic characteristics can be explained by a common clonal origin. They are likely to represent genotypic variants of the same clone, which, over time, suffered minor rearrangements. Curiously, the Spanish strain SM28 exhibited an identical DNA profile to that of the Portuguese isolates. This observation suggests that the OXA-40-producing strain might be dispersed in hospitals throughout the Iberian Peninsula. Moreover, the results reveal that the spread of this clone dates to at least 1995.

Geographical spread, at a national or international scale, may be an important feature in the epidemiology of *A. baumannii*. Increased resistance among *A. baumannii* isolates has been generally observed in the last decades. However, because epidemiological relatedness of strains was not assessed in most of these studies, susceptibility data may have been influenced by the unrecognized inclusion of epidemic strains that are often multidrug resistant. Our results indicate that the observed carbapenem resistance among Portuguese *A. baumannii* isolates is due to the emergence of a resistant strain under antimicrobial selective pressure and the spread of an OXA-40-producing epidemic clone. This observation emphasizes the importance of having effective infection control measures in our hospitals, such as early detection of colonized patients, isolation procedures and a judicious use of antibiotics.

In summary, the present work reports for the first time the dissemination among Portuguese hospitals of an *A. baumannii* strain carrying *bla*<sub>OXA-40</sub>, a clone endemic for several years in this country, and genetically related to the SM28 strain from Spain.

### 3.1. LONG-TERM DISSEMINATION OF AN OXA-40 CARBAPENEMASE-PRODUCING *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLONE IN THE IBERIAN PENINSULA

---

#### 3.1.6 Acknowledgements

We thank FCT, POCTI (FEDER), Centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra and ADEIM (Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação da Microbiologia) for financial support. Members of the Portuguese Resistance Study Group are: Maria José Salgado, Melo Cristino e Luís Lito (Hospital de Sta Maria, Lisboa), Graça Ribeiro (Hospitais da Universidade de Coimbra) and Helena Ramos (Hospital de Santo António, Porto).

#### 3.1.7 References

AFZAL-SHAH, M., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 583–588.

BOU, G., CERVERÓ, G., DOMÍNGUEZ, M., QUEREDA, C. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000a. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3299–3305.

BOU, G., OLIVER, A. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000b. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1556–1561.

CORBELLA, X., MONTERO, A., PUJOL, M., DOMÍNGUEZ, M., AYATS, J., ARGERICH, M., GARRIGOSA, F., ARIZA, J. & GUDIOL, F., 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4086–4095.

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

DA SILVA, G. J. D., CORREIA, M., VITAL, C., RIBEIRO, G., SOUSA, J. C., LEITÃO, R., PEIXE, L. & DUARTE, A., 2002. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 33–39.

DONALD, H. M., SCAIFE, W., AMYES, S. G. B. & YOUNG, H.-K., 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 196–199.

GRUNDMAN, H. J., TOWNER, K. J., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., MAHER, N., SEIFERT, H. & VANECHOUTTE, M., 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 3071–3077.

HÉRÉTIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenemhydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 268–273.

LOPEZ-OTSOA, F., GALLEGRO, L., TOWNER, K. J., TYSALL, L., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 4741–4743.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D. & SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233–2239.

### 3.2 Clonal diversity and carbapenemase production in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated in a Portuguese hospital, during a four year period

S. Quinteira<sup>1,2</sup>, H. Ramos<sup>3</sup>, J. Amorim<sup>3</sup> and L. Peixe<sup>1\*</sup>

Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto<sup>1</sup>; Laboratório de Microbiologia, Hospital Geral de Santo António, Porto<sup>3</sup> and Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Vila Nova de Famalicão,<sup>2</sup> Portugal. \*Corresponding author. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

#### 3.2.1 Synopsis

**Objectives:** Carbapenemase production has been observed in Portuguese clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, associated to IMP-5 and OXA-40 enzymes. In this work, we investigated the clonal relatedness of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated from a University Hospital with a high rate of imipenem resistance, together with the relative contribution of carbapenemase production.

**Methods:** Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (n=153) were isolated between March 2001 and October 2004, from patients attending a University Hospital in Porto. MICs to  $\beta$ -lactams were determined by the Etest and agar dilution methods. Susceptibility to non- $\beta$ -lactam antibiotics was performed by the disk diffusion method. Carbapenemase producing strains were detected by a bioassay. Oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes were sought by PCR with primers specific for *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and the obtained products were sequenced. Genomic macrorestriction analysis was obtained after digestion with *Apal* restriction enzyme.

**Results:** Imipenem resistance in *Acinetobacter* spp. increased from 32% (n=47) in 2001 to 53% (n=31) in 2002, and almost all isolates obtained during 2003 and 2004 showed imipenem resistance. All but one of the isolates were *A. baumannii*, corresponding to clones A, B and C and a single *Acinetobacter haemolyticus* isolate was identified. No PCR evidence suggested the presence

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

of *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* or *bla<sub>SPM-1</sub>* type genes in all the isolates. 82 carbapenem-resistant isolates yielded a PCR product with primers specific for *bla<sub>OXA-24-like</sub>*. Sequencing showed the presence of an OXA-40 enzyme and analysis of PFGE revealed that these isolates belong to clone A and *Acinetobacter haemolyticus* isolate. Resistance to all  $\beta$ -lactams and variable susceptibility to amikacin and tobramycin was a common feature of this clone. Macrorestriction analysis of other 71 imipenem-resistant isolates demonstrated the simultaneous dissemination of another clonal type (clone B and C), which differs also in the susceptibility patterns. Most of the strains tested in this study were susceptible to colistin (92,8% ) at a breakpoint of  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ .

**Conclusions:** The high rate of imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in this hospital is mainly associated to the presence of two endemic clones. Although the spreading of OXA-40 enzyme, in Portugal, is mainly related with the progressive dissemination of a single *Acinetobacter baumannii* clone, that persists until 2004, the presence of this enzyme in a different, previously unreported, genomic species, *Acinetobacter haemolyticus*, may reveal new insights in the OXA-40 ways of dissemination.

### 3.2.2 Introduction

*Acinetobacter baumannii* is an important cause of nosocomial infections including pneumonia, septicemia, urinary tract infections and wound infections, mainly observed in intensive care units (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996). Numerous outbreaks of *Acinetobacter* spp. infections have been reported, often associated with the spread of multiresistant strains (Bou *et al.*, 2000a; Corbella *et al.*, 2000). Ultimately, carbapenems have been used as a therapeutic option for the treatment of such infections. However, infections and hospital wide outbreaks due to carbapenem-resistant *A. baumannii* are increasingly reported in many countries (Afzal-Shah & Livermore, 1998; Corbella *et al.*, 2000; Tankovic *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 1999; Bou *et al.*, 2000a). As a result, nontraditional and more toxic agents, including polymyxin B and colistin, have been used as alternative therapeutic drugs in order to treat patients infected with multiresistant *A. baumannii* (Vasen *et al.*, 2000; Appleman *et al.*, 2000; Katragkou & Roilides, 2005).

Resistance to carbapenems increased (Corbella *et al.*, 2000), in part due to

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

*Acinetobacter* isolates producing metallo- $\beta$ -lactamases (Da Silva *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2001; Yum *et al.*, 2002a), but also because most *Acinetobacter* strains produce class D  $\beta$ -lactamases (OXA-type enzymes) (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Bou *et al.*, 2000b).

Although carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* seem mostly sporadic in northern Europe, they are endemic in the Iberian Peninsula (Corbella *et al.*, 2000; Gallego & Towner, 2001; Lopez-Otsoa *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004). As a result, cyclic outbreaks emerge and, in 2004, several patients died in Portuguese hospitals due to multiresistant *A. baumannii* infections.

Emergence of carbapenem-resistance in Portuguese *A. baumannii* seems to be related with the presence of an OXA-40-producing clone endemic for several years in this country and disseminated in the Iberian Peninsula (Da Silva *et al.*, 2004), rather than with the  $\beta$ -lactamase dissemination, as observed, for instance, with OXA-23 and OXA-58 carbapenem-hydrolyzing oxacillinases (Héritier *et al.*, 2005a; Poirrel *et al.*, 2005).

In this work, we investigated the clonal relatedness and the relative contribution of carbapenemase production in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated from a University Hospital with a high rate of imipenem resistance.

### 3.2.3 Materials and methods

#### 3.2.3.1 Bacterial strains

A total of 153 imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates were collected during a four year time period (January 2001 to October 2004) from patients attending a university teaching hospital, with more than 600 beds, in Porto, Portugal. These isolates were collected from different patients attending different services, including ICUs, surgery, and medicine wards, and were recovered from a variety of clinical specimens (Table 3.1). Isolates were identified using the API32GN system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and by sequencing the 16S rRNA genes.

### 3.2.3.2 Susceptibility tests

Susceptibility to  $\beta$ -lactam and non- $\beta$ -lactam antibiotics was performed by the disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (formerly known as NCCLS) recommendations (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Minimum inhibitory concentrations (MICs) of colistin (Sigma, St. Louis, Mo.) were determined using the agar dilution method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003), and were evaluated for both of the susceptible breakpoints:  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (Gales *et al.*, 2001b) and  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  (Catchpole *et al.*, 1997).

### 3.2.3.3 Determination of carbapenemase activity

Carbapenemase producing strains were detected by a bioassay using imipenem discs (10 $\mu\text{g}$ ) with enzymatic extracts. Inactivation of imipenem was demonstrated by growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 strain within the expected inhibition zone, suggesting the presence of a carbapenemase.

### 3.2.3.4 PCR amplification and sequencing

The presence of *bla*<sub>OXA</sub> gene was determined using the *bla*<sub>OXA-24-like</sub> primers (Bou *et al.*, 2000a). The amplification reaction conditions consisted of an initial denaturation step of 3 min/94°C, followed by 30 cycles of denaturation 1 min/94°C, annealing 1 min/50°C and elongation 2 min/72°C, with a final extension of 8 min/72°C. Obtained products were sequenced on both strands.

Some isolates were also screened for the presence of a metallo- $\beta$ -lactamase both by PCR and by dot blot hybridization assays, using specific primers and specific probes for *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>SPM-1</sub> genes (Senda *et al.*, 1996a; Cardoso *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2004).

### 3.2.3.5 Chromosomal DNA analysis by PFGE

Typing was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Apal*-restricted genomic DNA as described previously (Gautom, 1997). Plug slices of the samples were loaded and electrophoresed in 1,8% Seakem Gold agarose

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

with standard 0.5X TBE running buffer. The electrophoresis was performed with a CHEF-DRII apparatus (Bio-Rad) at 200 V for 25 h, with pulse times ranging from 5 to 13 s. Macrorestriction fragments were visually compared and interpreted according to the criteria of Tenover *et al.* (1995).

#### 3.2.3.6 Genetic location of *bla*<sub>OXA-40</sub> and hybridization experiments

Total DNA digest with I-CeuI enzyme, its separation by PFGE, and hybridization with *bla*<sub>OXA-40</sub> and rRNA probes, as described previously (Héritier *et al.*, 2003), was performed in order to assess the genetic location of the *bla*<sub>OXA-40</sub> gene.

#### 3.2.3.7 Statistical analysis

Difference between imipenem-resistance proportions for each consecutive pair of sampled year were calculated in Statistica 7.0, after Bonferroni adjustments.

### 3.2.4 Results

#### 3.2.4.1 Susceptibility tests and PFGE typing

Sequencing of the 16S rRNA genes showed that all but one of the isolates were *A. baumannii*, and a single *Acinetobacter haemolyticus* isolate was identified.

The results of antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. isolates showed that imipenem-resistance significantly increased from 2001 to 2002 (Difference between two proportions; N1=147, pr1=0.32; N2=59, pr2=0.53; p<0.01), also from 2002 to 2003 (Difference between proportions; N1=59, pr1=0.53; N2=107, pr2=0.97; p<0.001), and no significant differences were observed between 2003 and 2004 (Difference between proportions; N1=107, pr1=0.97; N2=43, pr2=0.98; p=0.74).

Imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. were isolated from several specimen sources and from more than ten different hospital wards, mainly from intensive care units, where *A. baumannii* were implicated, during several months, in nosocomial infections and colonizations (Table 3.1).

Genotypic comparison was carried out by PFGE for evaluating clonality of *Acinetobacter* spp. isolates and genotype analysis identified three distinct PFGE

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

Table 3.1: Clinical data of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* <sup>a</sup>

| Year | Imipenem resistance %<br>(n° Isolates) | Clone (n° isolates) | Ward (n° Isolates)                                                                                          | Main Specimen Sources (n° Isolates)                                                                                     |
|------|----------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2001 | 32% (n=47)                             | A (14)              | ICU (8); UCIP (2); UCPO (1); NC (2); NK (1)                                                                 | Respiratory tract (12) <sup>b</sup> ; Urine (1); NK (1)                                                                 |
|      |                                        | B (33)              | ICU (6); UCIP (14); TCE (3); Surgical Cir12B (3); Med A, B, D (3); OBS (2); Neurology (1); Orthopaedics (1) | Respiratory tract (13); Urine (9); Pus (4); Catheter (3); Blood (3); LCR (1)                                            |
| 2002 | 53% (n=31)                             | A (6)               | ICU (4); Med B, C (2)                                                                                       | Respiratory tract (5); Urine (1)                                                                                        |
|      |                                        | B (18)              | Med B, D (7); ICU (4); UCIP (3); Neurology (2); Orthopaedic (1); Urology (1)                                | Respiratory tract (6); Urine (8); Pus (1); Blood (2); Catheter (1)                                                      |
| 2003 | 97% (n=104)                            | A (39)              | ICU (21); TCE (1); UCPO (3); Med D (2); Orthopaedic (1); NC (3); Surgical (7); Urology (1)                  | Respiratory tract (23); Pus (3); LCR (1); Blood (4); Urine (3); Ascitic liquid (1); Catheter (2); Peritoneal liquid (2) |
|      |                                        | B (8)               | Surgical Cir 2 (2); Med (5); UCIP (1)                                                                       | Respiratory tract (3); Urine (4); Blood (1)                                                                             |
| 2004 | 98% (n=42)                             | C (2)               | Med D (1); UCIP (1)                                                                                         | Catheter (1); Urine (1)                                                                                                 |
|      |                                        | A (9)               | ICU (4); Surgical (1); NC (1); Med (1); OBS (1); Oncol (1)                                                  | Respiratory tract (6); Blood (1); NK (2)                                                                                |
|      |                                        | B (1)               | GIN (1)                                                                                                     | Urine (1)                                                                                                               |

<sup>a</sup>ICU, intensive care unit; Med, medical; UCIP, polivalent ICU; UCPO, postsurgical ICU; OBS, observation; NC, neurosurgery; TCE, cranium-encephalic traumatism; LCR, cephalo-rachidian liquid; NK, unknown origin

<sup>b</sup>Respiratory tract includes: sputum, bronchial secretions and tracheal aspirate

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

profiles (Figure 3.2), according to Tenover criteria (Tenover *et al.*, 1995), corresponding to pulsotypes A, B, and C. Pulsotypes A and B persisted in this hospital, until now, at least, since 2001, with pulsotype B the predominant one in 2001 and 2002, when clone A started being the dominant type. *A. baumannii* isolates belonging to clone A showed the same PFGE pattern of Portuguese isolates belonging to the previously described Iberian OXA-40-producing clone (Da Silva *et al.*, 2004). Pulsotype C, represented by two isolates recovered in 2003, in medicine ward and intensive care unit, respectively, and *Acinetobacter haemolyticus* seem to represent a sporadic event within an endemic situation of two *A. baumannii* clones. The resistance profile to  $\beta$ -lactam and non- $\beta$ -lactam antibiotics varied among isolates according to different clones. Isolates of clone A showed resistance to almost all  $\beta$ -lactams including imipenem, meropenem and ertapenem (MIC of  $\geq 32$  mg/L), to amoxicillin and its association with clavulanic acid, ureidopenicillins and their associations, cefoxitin and ceftazidime (MIC of  $\geq 256$  mg/L), to cefepime (MIC of  $\geq 32$  mg/L), cefpirome (MICs between 64 and 256 mg/L), and a variable behaviour to aztreonam (MICs between 8 and 256 mg/L). Isolates belonging to this clone were also resistant to ciprofloxacin, whereas the susceptibility profile to aminoglycosides was variable. One isolate of clone B was of intermediate susceptibility to imipenem and ertapenem (MIC of 16 and 8 mg/L, respectively), and the others were resistant (MIC of  $\geq 32$  mg/L). Isolates belonging to this clone showed resistance to amoxicillin and its association with clavulanic acid (MICs between 64 and 256 mg/L), ureidopenicillins and their associations, and cefoxitin (MIC of  $\geq 256$  mg/L), susceptibility and intermediate behaviour to meropenem (MICs between 2 and 8 mg/L), susceptibility to ceftazidime (MICs between 4 and 8 mg/L), variable behaviour to cefepime and cefpirome (MICs between 8 and 24 mg/L), and to aztreonam (MICs between 16 and 256 mg/L). Curiously, isolates recovered in 2001-2002 showed susceptibility to cefepime, but became resistant to this antibiotic after 2003. Isolates belonging to this clone were also resistant to ciprofloxacin, whereas the susceptibility profile to aminoglycosides was variable, differing from clone A in being susceptible to netilmicin and minocycline. The two isolates of clone C were resistant to imipenem and ertapenem (MIC of 32 and 16 mg/L, respectively), to amoxicillin (MIC of 128 mg/L), and its association with clavulanic acid (MIC of  $\geq 256$  mg/L), to piperacillin and piperacillin + tazobactam (MIC of 64 mg/L), to ticarcillin and ticarcillin + clavulanic acid and cefoxitin

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

(MIC of  $\geq 256$  mg/L), but remained susceptible to meropenem (MIC of 4 mg/L), aztreonam (MIC of 8 mg/L), ceftazidime (MIC of 4 mg/L) and to cefepime (MIC of 2 mg/L). Bioassays, performed in order to detect carbapenemase producing strains, were positive for isolates from clone A (with exception of three isolates) and negative for isolates belonging to clones B and C.

The *Acinetobacter haemolyticus* isolate presented resistance to imipenem, meropenem, ertapenem (MIC of  $\geq 32$  mg/L), to amoxicillin and its association with clavulanic acid, ureidopenicillins and their associations (MIC of  $\geq 256$  mg/L), and was susceptible to cefepime and ceftazidime (MIC of 8 mg/L), ceftazidime and aztreonam (MIC of 4 mg/L).

Although the NCCLS (CLSI) guidelines do not currently provide interpretative criteria for the test of polymyxins, a breakpoint concentration of 4  $\mu\text{g/mL}$  for colistin was recently validated and recommended (Gales *et al.*, 2001b). The vast majority (96,7%), of the strains tested in this study were susceptible to concentrations of colistin at or below 4 mg/L (Catchpole *et al.*, 1997), with only 11 isolates showing a colistin MIC of  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ . However, when the breakpoint concentration of  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  (Gales *et al.*, 2001b; Jones *et al.*, 2005a) is applied, the susceptibility rate dropped from 96,7% to 92,8%.

### 3.2.4.2 PCR analysis

Metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates were not detected in any of the imipenem-resistant *Acinetobacter* isolates.

82 imipenem-resistant isolates yielded a PCR product with primers specific for *bla*<sub>OXA-24-like</sub>. Sequencing showed the presence of an OXA-40 enzyme and analysis of PFGE revealed that these isolates belonged to the previously reported *A. baumannii* clone (Da Silva *et al.*, 2004), clone A, disseminated in other Portuguese hospitals that became predominant since 2003, and to a new species, *A. haemolyticus*. Macrorestriction analysis of other 71 imipenem-resistant isolates revealed the simultaneous dissemination of clonal types B and C (with only two isolates), which differs from clone A, in addition to the absence of OXA-40, in susceptibility patterns. Interestingly, three isolates belonging to clone A did not presented a *bla*<sub>OXA-24-like</sub> PCR-positive result.

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

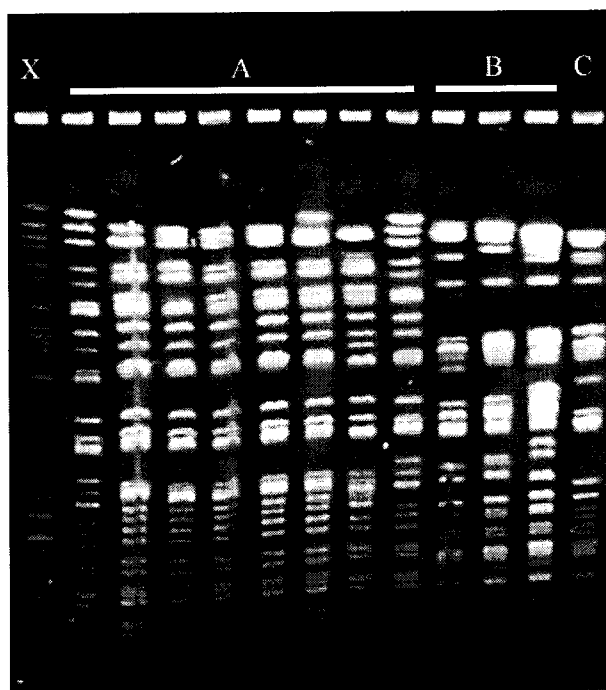


Figure 3.2: PFGE patterns of representative *Acinetobacter* spp. isolates after digestion with *Apal*

#### 3.2.4.3 Genetic location of *bla*<sub>OXA-40</sub> in *A. baumannii*

Five fragments were generated from I-CeuI-restricted DNAs of *A. baumannii* isolates and seven from the *Escherichia coli* K12 (used as a control strain). The DNA probe for rRNA genes hybridized with the endonuclease I-CeuI-generated fragments. The *bla*<sub>OXA-40</sub> probe hybridized with chromosomal fragments, indicating the chromosomal location of this gene (data not shown).

### 3.2.5 Discussion

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* has recently been established as an important nosocomial pathogen in several Portuguese hospitals (Da Silva *et al.*, 2004, , Quinteira, personal observation), including the hospital of the present study, where, at least since 2001, important outbreaks have systematically emerged. These outbreaks, widely spread among different hospital wards, as also observed in this study (see Table 1), have been increasing throughout the last few years with direct repercussions to public health.

Since 1998, a high imipenem resistance incidence, among nosocomial *A. baumannii* isolates, has been observed in Portugal (Da Silva *et al.*, 2004). An IMP-5 carbapenemase was found in an *A. baumannii* strain isolated in one Portuguese hospital (Da Silva *et al.*, 2002), but carbapenem-resistance among Portuguese clinical *Acinetobacter* strains seems to be mainly related with an OXA-40-producing epidemic clone that persists at least since 1995 ((Da Silva *et al.*, 2004). It is important to stress that this clone has already been described from Spain, thus suggesting an Iberian clonal dissemination.

One of the main goals of this study was to ascertain whether the observed *Acinetobacter* spp. imipenem resistance in this hospital was a result of the dissemination of an imipenem resistance determinant (e.g. OXA-type enzyme) and/or the spread of a *A. baumannii* clone.

Basically, two major clones (A and B), widespread throughout the entire hospital settings, and that account for the vast majority of resistant strains, seemed to be involved in *Acinetobacter* spp. resistance to imipenem in this hospital. These two clones became endemic, persisting through, at least a four-year period, although several elimination attempts including polymyxin use. Of the 153 imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates, 82 (54%) were observed to present an OXA-40 type enzyme (clone A and *A. haemolyticus*). The imipenem resistance of the remaining isolates (clones B and C), although not yet fully understood, may be related with a reduced permeability of the outer membrane and alteration in PBPs. Since clone B persisted through time, some bioassays were performed and the emerging results suggested the absence of an imipenem-hydrolyzing enzyme. Ongoing studies will allow for the definite understanding of clone B resistance mechanisms. All of the OXA-40-producing isolates belonging

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

to *A. baumannii* clone A presented a similar antibiotic resistance profile and a very similar PFGE pattern, suggesting a common clonal origin. This observation is in agreement with the previously described Iberian dissemination of an OXA-40-producing *A. baumannii* clone since PFGE profiles of clone A were identical to those described in Da Silva *et al.* (2004) (data not shown). Interestingly, this clone seems also to be already present in France (Héritier *et al.*, 2003). Apart from the endemic *A. baumannii* clone carrying OXA-40, which became predominant in the last years, it seems important to point out the fact that this previously described as chromosomally-encoded enzyme (Héritier *et al.*, 2003) was also observed in a different species (*A. haemolyticus*), although this seemed to represent a sporadic event within an endemic situation of two major clones.

Metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates were not detected in any of the imipenem-resistant *Acinetobacter* isolates, even though, *bla*<sub>IM-2</sub>-carrying *P. aeruginosa* were already observed in this hospital (Quinteira, personal observation). Currently, only colistin showed *in vitro* activity against the majority of *Acinetobacter* spp. strains in this hospital, an observation that agreed with other published reports (Catchpole *et al.*, 1997; Appleman *et al.*, 2000; Vasen *et al.*, 2000; Gales *et al.*, 2001b). In fact, colistin, although its toxicity (Ouderkirk *et al.*, 2003), has been used in the treatment of the more severe infections caused by *A. baumannii* multidrug-resistant strains (Amorim, personal communication), as a last and only therapeutic option.

Taking into consideration the geographical dissemination of clone A, responsible for imipenem-resistance in several isolates of *A. baumannii* in this hospital, that has rapidly spread throughout the Iberian Peninsula to France, it seems urgent to evaluate the spreading potential of clone B that, even though presenting a different mechanism of resistance, is capable of identical outcomes.

Monitoring nosocomial-acquired infections, antibiotic usage, identification of strains with epidemic potential and more restrict infection control measures in the hospital setting are tools of capital importance for the prevention of multidrug-resistant bacteria dissemination. Simultaneously, in order to efficiently control MDR resistant bacteria outbursts, the biogeographical pathways of dissemination need to be clearly identified and recurrent patterns pinpointed, using available historical information from each episode of clonal spreading, such as those reported in this study.

### 3.2.6 Acknowledgements

We are grateful to Nuno Monteiro for helpful discussions and critical review of the manuscript. Sandra Quinteira is a PhD student from Programa PRODEP.

### 3.2.7 References

AFZAL-SHAH, M. & LIVERMORE, D., 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**: 576–577.

AFZAL-SHAH, M., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 583–588.

APPLEMAN, M., BELZBERG, H., CITRON, D., HESELTINE, P., YELLIN, A., MURRAY, J. & BERNE, T., 2000. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1035–1040.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. & TOWNER, K., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **9**: 148–165.

BOU, G., CERVERÓ, G., DOMÍNGUEZ, M., QUEREDA, C. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000a. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3299–3305.

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

BOU, G., OLIVER, A. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000b. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1556–1561.

CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.

CATCHPOLE, C., ANDREWS, J., BRENWALD, N. & WISE, R., 1997. A reassessment of the in vitro activity of colistin sulphomethate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**: 255–260.

CHU, Y., AFZAL-SHAH, M., HOUANG, E. T., PALEPOU, M. I., LYON, D. J., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2001. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong-Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 710–714.

CORBELLA, X., MONTERO, A., PUJOL, M., DOMÍNGUEZ, M., AYATS, J., ARGERICH, M., GARRIGOSA, F., ARIZA, J. & GUDIOL, F., 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4086–4095.

DA SILVA, G. D., LEITÃO, R. & PEIXE, L., 1999. Emergence of carbapenem-hydrolysing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 2109–2110.

DA SILVA, G. D., QUINTEIRA, S., SOUSA, E. B. J. C., GALLEGU, L., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2004. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 255–258.

DA SILVA, G. J. D., CORREIA, M., VITAL, C., RIBEIRO, G., SOUSA, J. C., LEITÃO, R., PEIXE, L. & DUARTE, A., 2002. Molecular characterization of

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

blaIMP-5, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 33–39.

GALES, A., REIS, A. & JONES, R., 2001. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 183–190.

GALLEGO, L. & TOWNER, K. J., 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 741–77.

HÉRITIER, C., DUBOIX, A., POIREL, L., MARTY, N. & NORDMANN, P., 2005. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 115–118.

HÉRITIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 268–273.

JONES, R., ANDEREGG, T., SWENSON, J. & GROUP, T. Q. C. W., 2005. Quality control guidelines for testing gram-negative control strains with polymyxin B and colistin (polymyxin E) by standardized methods. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 925–927.

KATRAGKOU, A. & ROILIDES, E., 2005. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with colistin. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4916–4917.

LOPEZ-OTSOA, F., GALLEGO, L., TOWNER, K. J., TYSALL, L., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2002. Endemic carbapenem resistance associ-

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

ated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 4741–4743.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Sixth edition: approved standard M7-A6. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

OUDEKIRK, J., NORD, J., TURETT, G. & KISLAK, J., 2003. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 2659–2662.

POIREL, L., MAGALHÃES, M., LOPES, M. & NORDMANN, P., 2004. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>SPM-1</sub>*-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1406–1409.

POIREL, L., MARQUE, S., HERITIER, C., SEGONDS, C., CHAVANON, G. & NORDMANN, P., 2005. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 202–208.

SENDA, K., ARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OH-SUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA., M., 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.

TANKOVIC, J., LEGRAND, P., GATINES, G., CHEMINEAU, V., BRUN-BUISSON, C. & DUVAL, J., 1994. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 2677–2681.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D. & SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting chromosomal

EPIDEMIOLOGIA DE *ACINETOBACTER* SPP., DE ORIGEM HOSPITALAR,  
RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS. DETECÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE CARBAPENEMASES. PESQUISA DE UNIDADES  
DE CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233–2239.

VASEN, W., DESMERY, P., ILUTOVICH, S. & MARTINO, A., 2000. Intrathecal use of colistin. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3523.

YUM, J., YI, K., LEE, H., YONG, D., LEE, K., KIM, J., ROSSOLINI, G. & CHONG, Y., 2002. Molecular characterization of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two novel integrons carrying *bla<sub>IMI-2</sub>* gene cassettes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 837–840.

### 3.2. CLONAL DIVERSITY AND CARBAPENEMASE PRODUCTION IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER* SPP. ISOLATED IN A PORTUGUESE HOSPITAL, DURING A FOUR YEAR PERIOD

---

## Capítulo 4

# Epidemiologia de *Pseudomonas aeruginosa*, de origem hospitalar, produtoras de carbapenemases. Caracterização das carbapenemases, das unidades de captura genética associadas e sua localização

---

Lista de trabalhos que integram este capítulo:

- [1] Quinteira, S., Sousa, J.C. & Peixe, L., (2005). Characterization of *In100*, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbapenemase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(1): 451–453. doi:10.1128/AAC.49.1.451–453.2005. [2] Quinteira, S. & Peixe, L., (Submetido para publicação). Multi-layered dissemination processes of *bla<sub>VIM-2</sub>* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.

#### 4.1. CHARACTERIZATION OF IN100, A NEW INTEGRON CARRYING A METALLO- $\beta$ -LACTAMASE AND A CARBENICILLINASE, FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

---

### 4.1 Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*

S. Quinteira<sup>1,2</sup>, J. C. Sousa<sup>1</sup> and L. Peixe<sup>1\*</sup>

Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto,<sup>1</sup> and Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Vila Nova de Famalicão,<sup>2</sup> Portugal. \*Corresponding author. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

#### 4.1.1 Abstract

In100, a new integron carrying a carbapenemase gene (*bla<sub>IM-2</sub>*) associated with a carbenicillinase (*blaP1b*) and aminoglycoside resistance genes (*aacA4* and *aadA2*), was detected in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. The particular gene cassette organization of In100 seems to reflect the evolution of antibiotic usage in therapeutics.

#### 4.1.2 Note

Carbenicillin was introduced in therapeutics in 1967 and was especially useful, on its own or when associated with aminoglycosides, for the treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Rolinson, 1998), a well-recognized nosocomial pathogen with intrinsic resistance to various antimicrobial agents and the ability to develop multidrug resistance (Pai *et al.*, 2001). Nevertheless, an increasing frequency of *P. aeruginosa* isolates resistant to these antibiotics and to newer  $\beta$ -lactams has been observed during the last decades, thus determining the use of the most potent  $\beta$ -lactams, carbapenems (Livingstone *et al.*, 1995). Intensive use of these antibiotics eased the emergence of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* (Giakkoupi *et al.*, 2003a), among others, due to the production of metallo- $\beta$ -lactamases, mainly IMP and VIM types (Jeong *et al.*, 2003; Lauretti *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 2000). Initially reported in Japan (Osano *et al.*, 1994), the new metallo- $\beta$ -lactamases, have spread worldwide, nowadays being reported in gram-negative isolates from Europe (Cardoso *et al.*, 2002; Giakkoupi *et al.*,

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

2003a; Jeong *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2000b), Asia (Jeong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002) and, more recently, North America (Toleman *et al.*, 2004).

Most IMP- and VIM-like gene cassettes are found on class 1 integrons, with variable structures among isolates (Lee *et al.*, 2002). In theory, gene cassettes can be incorporated at different positions in the integron (Collis *et al.*, 2001); however, it seems that cassettes are preferentially integrated adjacent to the attI1 site (Collis *et al.*, 2001; Partridge *et al.*, 2000), with the order of the gene cassettes possibly reflecting antibiotic pressure (Collis & Hall, 1995).

In this study, we report the genetic characterization of a novel class 1 integron carrying *bla*<sub>VIM-2</sub> associated with carbenicillinase and aminoglycoside resistance genes, identified in a *P. aeruginosa* blood isolate (FF-PS2) from a patient located in the intensive care unit of a hospital in Coimbra, Portugal, in 2000. MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics were determined by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden), and the susceptibility to aminoglycosides and ciprofloxacin was determined by the disk diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Analytical isoelectric focusing (IEF) was performed with crude extracts on a pH 3-to-9 polyacrylamide gel (Phast gels; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and  $\beta$ -lactamases were visualized with nitrocefin (100  $\mu$ M) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). A bioassay (Cardoso *et al.*, 2002) was employed in order to detect metallo- $\beta$ -lactamase production. *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> genes were detected by a multiplex PCR assay with VIM/IMP primers (Cardoso *et al.*, 2002; Senda *et al.*, 1996a), and class 1 integrons were detected with previously described specific primers (Lévesque *et al.*, 1995; Riccio *et al.*, 2000). Extraction of plasmid DNA was carried out with the QIAGEN plasmid kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Transfer of resistance genes was screened by mating with rifampin-resistant *P. aeruginosa* strain PAO or rifampin-resistant *Escherichia coli* strain K802N. Transconjugant selection was performed in Mueller-Hinton agar plates containing rifampin (100  $\mu$ g/ml) (Sigma, St. Louis, Mo.) and amoxicillin (30  $\mu$ g/ml) (Sigma) or imipenem (2  $\mu$ g/ml) (Merck Sharp & Dohme, Portugal) when *Escherichia coli* K802N and *P. aeruginosa* PAO were used as recipients, respectively. A possible chromosomal location of the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene was determined by hybridization of I-CeuI-digested genomic DNA with probes labeled with the ECL enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences Europe GmbH) for *bla*<sub>VIM-2</sub> and the 16S and 23S

#### 4.1. CHARACTERIZATION OF IN100, A NEW INTEGRON CARRYING A METALLO- $\beta$ -LACTAMASE AND A CARBENICILLINASE, FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

---

rRNA genes, as previously described (Héritier *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1993). The PCR product obtained with the class 1 integron primers INT/5'CS (Riccio *et al.*, 2000) and 3'CS (Lévesque *et al.*, 1995) was purified with the StrataPrep PCR purification kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), and the insert was ligated into the pPCR-Script Cam SK(+) cloning vector (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and transformed into *Epicurian coli* XL10-Gold Kan ultracompetent cells (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Luria-Bertani agar plates supplemented with ampicillin (50  $\mu$ g/ml), chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), and IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) were used as selection plates. The nucleotide sequence of the class 1 integron containing *bla<sub>VIM-2</sub>* was determined in both directions through a primer-walking strategy using specific designed primers in both direct and cloned PCR products.

*P. aeruginosa* FF-PS2 was detected in the context of the regular screening for metallo- $\beta$ -lactamase producers among carbapenem-resistant nonfermenters from clinical and environmental sources. The isolate was highly resistant to piperacillin (>256  $\mu$ g/ml), piperacillin-tazobactam (>256  $\mu$ g/ml), ceftazidime (32  $\mu$ g/ml), cefepime (>32  $\mu$ g/ml), imipenem (>32  $\mu$ g/ml), and meropenem (>32  $\mu$ g/ml) but remained susceptible to aztreonam (8  $\mu$ g/ml). It was also resistant to tobramycin, gentamicin, amikacin, netilmicin, and ciprofloxacin. By IEF, three  $\beta$ -lactamase bands with pIs of 5.3, 5.7, and >8.2 were observed.

Confirming the positive bioassay, suggestive of a metallo- $\beta$ -lactamase production, a multiplex PCR assay to amplify both *bla<sub>VIM</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* genes from FF-PS2 genomic DNA revealed an amplicon compatible with the presence of *bla<sub>VIM</sub>*. No plasmid DNA was detectable by agarose gel electrophoresis, and conjugation experiments failed to demonstrate the occurrence of conjugative transfer of  $\beta$ -lactamase determinants. These results suggested the chromosomal location of *bla<sub>VIM</sub>*, which was confirmed after the I-CeuI technique and hybridization with *bla<sub>VIM-2</sub>* and rRNA probes.

Sequencing of a ca. 4,000-bp fragment revealed a class 1 integron containing an original array of four gene cassettes, named In100 (Fig. 4.1). Most integrons containing *bla<sub>VIM</sub>* genes usually carry two or more gene cassettes (Lauretti *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2001a), but this is the first report of a class 1 integron containing a carbapenemase gene associated with another  $\beta$ -lactamase gene cassette. A

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---



Figure 4.1: Schematic representation of the *P. aeruginosa* FF-PS2 class 1 integron, In100

closer look at the genetic structure of this integron revealed a gene cassette array that might reflect the evolution of antibiotic usage. The *bla<sub>VIM-2</sub>* gene cassette in In100, identical to that reported for In56 (Poirel *et al.*, 2000b), was found in the first position of the integron, which indicates it was the most recently acquired gene cassette (Fig. 4.1). The start codon (ATG) of *bla<sub>VIM-2</sub>* was preceded by two putative promoter regions (with a weak promoter, P<sub>c</sub>; -35 [TGGACA] and -10 [TAAGCT]) and a P2 promoter in its inactive form (Fluit & Schmitz, 1999). An *aacA4* gene cassette encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase was found immediately downstream of the *bla<sub>VIM-2</sub>* cassette. The derived amino acid sequence of the *aacA4* allele demonstrated homology to AAC (6')-II enzyme, which modifies gentamicin, tobramycin, and netilmicin. The simultaneous presence of *bla<sub>VIM-2</sub>* and *aacA4* is a common occurrence among integrons carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes (Lauretti *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2001a). A higher number of nucleotides (24 bp) compared to those in the available GenBank *aacA4* sequences were observed in the upstream region of the start codon. Interestingly, the sequence immediately downstream of *aacA4* gene is identical to that of the *blaP1b* gene cassette described in In28 (GenBank accession no. AF313472), coding for PSE-1/CARB-2. Although PSE-1 has been reported as the most common acquired  $\beta$ -lactamase in *P. aeruginosa* isolates (Bert *et al.*, 2002), its gene has never been associated with another  $\beta$ -lactamase gene in the same integron. The IEF analysis revealed a  $\beta$ -lactamase with pI  $\sim$ 5.7, compatible to the production of PSE-1, as well as a  $\beta$ -lactamase band of pIs 5.3 and  $>$ 8.2, consistent with the presence of VIM-2 and chromosomal AmpC, respectively.

The fourth cassette present in In100 contained the *aadA2* gene coding for the aminoglycoside-3'-adenyltransferase and confers resistance to streptomycin and spectinomycin (Bito & Susani, 1994). The *aadA2* gene is the most frequently integrated gene cassette in class 1 integrons (Lévesque *et al.*, 1995), a fact that might

#### 4.1. CHARACTERIZATION OF *IN100*, A NEW INTEGRON CARRYING A METALLO- $\beta$ -LACTAMASE AND A CARBENICILLINASE, FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

---

be related to the early emergence of integrons carrying *aadA*, since streptomycin clinical availability and the resulting increase in selective pressure preceded that of other aminoglycosides and  $\beta$ -lactams.

The common human clinical use of  $\beta$ -lactams and aminoglycosides has been argued to contribute to the simultaneous presence of gene cassettes encoding  $\beta$ -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes in the same integron (Poirel *et al.*, 2001a; Toleman *et al.*, 2003). However, other ecological niches where antibiotics are used on a large scale, namely in animals for food production, may also contribute as sources and or reservoirs of integrons carrying resistance genes (Maynard *et al.*, 2003). The recent characterization of an integron carrying the same array of genes as *In100*, except *bla<sub>IM-2</sub>*, in a pig *P. aeruginosa* isolate might also support this possibility (S. Quinteira, *unpublished data*).

Novel gene cassettes are preferentially inserted at the 5'CS region of the integron, thus ensuring a stronger expression, forming a queue that ranges from the newest to the oldest inserted cassette (Collis *et al.*, 2001; Partridge *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* *In100* gene cassette organization can be viewed as a historical reflection of antibiotic usage in clinical therapeutics, thus further supporting the notion that the bacterial genome is an increasingly useful tool to unravel not only the basic phylogenetic patterns among microorganisms but also the specific direction of recent evolution within microbial species.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the EMBL/GenBank sequence databases and assigned accession no. AY560837.

##### 4.1.3 Acknowledgements

We thank Graça Ribeiro and Clementina Vital for donation of the *P. aeruginosa* FF-PS2 strain. We also thank Teresa Coque and Nuno Monteiro for critical review of the manuscript.

##### 4.1.4 References

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

BERT, F., BRANGER, C. & LAMBERT-ZECHOVSKY, N., 2002. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamases genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 11–18.

BITO, A. & SUSANI, M., 1994. Revised analysis of *aadA2* gene of plasmid pSa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 1172–1175.

CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.

COLLIS, C. M. & HALL, R. M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 155–162.

COLLIS, C. M., RECCHIA, G. D., KIM, M.-J., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase. *International Journal of Bacteriology* **183**: 2535–2542.

FLUIT, A. C. & SCHMITZ, F. J., 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* **18**: 761–770.

GIAKKOUPI, P., PETRIKKOS, G., TZOUVELEKIS, L. S., TSONAS, S., THE WHONET GREECE STUDY GROUP, LEGAKIS, N. J. & VATOPOULOS, A. C., 2003. Spread of integron-associated VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 822–825.

HÉRITIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 268–273.

#### 4.1. CHARACTERIZATION OF IN100, A NEW INTEGRON CARRYING A METALLO- $\beta$ -LACTAMASE AND A CARBENICILLINASE, FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

---

JEONG, S. H., LEE, K., CHONG, Y., YUM, J. H., LEE, S. H., CHOI, H. J., KIM, J. M., PARK, K. H., HAN, B. H., LEE, S. W. & JEONG, T. S., 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 397–400.

LAURETTI, L., RICCIO, M. L., MAZZARIOL, A., CORNAGLIA, G., AMICOSANTE, G., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G. M., 1999. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1584–1590.

LEE, K., LIM, J. B., YUM, J. H., YONG, D., CHONG, Y., KIM, J. M. & LIVERMORE, D. M., 2002. *bla<sub>VIM-2</sub>* cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1053–1058.

LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C. & ROY, P. H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 185–191.

LIU, S.-L., HESSEL, A. & SANDERSON, K. E., 1993. Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 6874–6878.

LIVINGSTONE, D., GILL, M. J. & WISE, R., 1995. Mechanisms of resistance to carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**: 1–5.

MAYNARD, C., FAIRBROTHER, J. M., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIÈRE, S. & HAREL, J., 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli*

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 3214–3221.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, N. C., 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement M100-S12. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

OSANO, E., ARAKAWA, Y., WACHAROTAYANKUN, R., OHTA, M., HORII, T., ITO, H., YOSHIMURA, F. & KATO, N., 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 71–78.

PAI, H., KIM, J.-W., KIM, J., LEE, J. H., CHOE, K. W. & GOTOH, N., 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 480–484.

PARTRIDGE, S. R., RECCHIA, G. D., SCARAMUZZI, C., COLLIS, C. M., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* **146**: 2855–2864.

POIREL, L., LAMBERT, T., TÜRKÖGLÜ, S., RONCO, E., GAILLARD, J.-L. & NORDMANN, P., 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla<sub>VIM-2</sub>* carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 546–552.

POIREL, L., NAAS, T., NICOLAS, D., COLLET, L., BELLAIS, S., CAVALLLO, J.-D. & NORDMANN, P., 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 891–897.

#### 4.1. CHARACTERIZATION OF IN100, A NEW INTEGRON CARRYING A METALLO- $\beta$ -LACTAMASE AND A CARBENICILLINASE, FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

---

RICCIO, M. L., FRANCESCHINI, N., BOSCHI, L., CARAVELLI, B., CORNAGLIA, G., FONTANA, R., AMICOSANTE, G. & ROSSOLINI, G. M., 2000. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla<sub>IMP</sub>* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1229–1235.

ROLINSON, G. N., 1998. Forty years of  $\beta$ -lactam research. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**: 589–603.

SENDA, K., HARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA., M., 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.

TOLEMAN, M. A., BIEDENBACH, D., BENNETT, D., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2003. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>IMP-13</sub>*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 583–590.

TOLEMAN, M. A., ROLSTON, K., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2004. *bla<sub>VIM-7</sub>*, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 329–332.

## 4.2 Multi-layered dissemination processes of *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

S. Quinteira,<sup>1,2</sup> and L. Peixe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal; <sup>2</sup> Instituto Politécnico da Saúde do Norte-ESSVA, Porto, Portugal. \*Corresponding author. E-mail: lpeixe@ff.up.pt.

### 4.2.1 Abstract

Nine clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, collected from 5 geographically distinct hospitals located at North and Center of Portugal between 2000 and 2004, with metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) activity and possessing the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene were characterized. Also, three previously reported *P. aeruginosa* *bla*<sub>VIM-2</sub> producers were included in order to investigate their genomic relatedness and to compare the structures of the genetic background for the VIM-2 determinants. Among them, 5 different structures of class 1 integrons were identified, which includes two novel *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integrons. Among the twelve isolates, ten distinct clones were observed. Clonal relatedness was observed between the oldest *bla*<sub>VIM-2</sub>-producing *P. aeruginosa* Portuguese isolate (from 1995) and the RON-1 isolate from France (isolated in 1998). Distinct genetic locations and simultaneous multiple copies of *bla*<sub>VIM-2</sub> are described. Three non-exclusive hypotheses are discussed in the explanation of the dissemination of VIM-2: clonal dissemination, *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integron dissemination, and *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassette dissemination.

### 4.2.2 Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a clinically important pathogen usually considered a leading cause of nosocomial infections, often difficult to treat due to its intrinsic and acquired resistance mechanisms to various antimicrobial agents. As a

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

result, carbapenems are usually used as a last resort for the treatment of multiresistant *Pseudomonas* isolates infections (Pournaras *et al.*, 2003). However, intensive use of these antibiotics eased the emergence of carbapenem-resistance in *P. aeruginosa* (Giakkoupi *et al.*, 2003a). The mechanisms of resistance to carbapenems in *P. aeruginosa* may result from hyperproduction of chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase and from reduced levels of drug accumulation or increased expression of pump efflux (Livermore, 1992). The resistance due to the production of metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs), initially thought uncommon, has emerged in the last decade as a worrisome phenomenon with an increasing number of studies reporting *P. aeruginosa* strains that produce acquired MBLs. Despite the fact that SPM-1 (Toleman *et al.*, 2002) and GIM-1 (Castanheira *et al.*, 2004) seem, up to now, to be restricted to Brazil and Germany, respectively, IMP and VIM variants of these MBLs are now emerging globally, namely in Asia (Giakkoupi *et al.*, 2003a; Lee *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001b; Yatsuyanagi *et al.*, 2004a), Europe (Bahar *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2002; Lauretti *et al.*, 1999; Pallecchi *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2001a, 2000b; Pournaras *et al.*, 2002) and Americas (Crespo *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004a,b; Pasteran *et al.*, 2005; Toleman *et al.*, 2002, 2004) in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp., and other gram-negative nonfermentors. *P. aeruginosa* seems to be the predominant VIM-type producer.

Until now, multiple allelic variants, namely VIM-1 to VIM-11 have been described, with VIM-7 being the most divergent with 77% amino acid identity to VIM-1, whereas the other enzymes vary among themselves by less than 11%. VIM-2 is the dominant VIM type enzyme and appears to be widely disseminated in most European countries (Castanheira *et al.*, 2004; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002; Poirel *et al.*, 2001a, 2000b; Pournaras *et al.*, 2003; Quinteira *et al.*, 2005a,b). As part of a general trend, the emergence of MBLs (specially VIM-2) in gram-negative bacilli has also been reported in Portugal (Cardoso *et al.*, 2002; Conceição *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2005a,b).

The very broad substrate specificity of VIM-type enzymes accounts for their notable clinical relevance, and their association to horizontally transferable capture genetic units may facilitate their dissemination. In fact, several plasmid (Pallecchi *et al.*, 2001)- and transposon- borne class 1 integrons carrying VIM genes (Toleman *et al.*, 2003), challenged the previously held opinions about the minor

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

spread potential of MBLs. Also, clonal spread of VIM-producers has been implicated in outbreaks of these carbapenemases (Cornaglia *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001b).

Taking into account that, since 1995, the emergence and spread of *bla*<sub>VIM-2</sub>-producing *P. aeruginosa* strains has been observed in Portugal, in the present study, a broader survey of the phenotypes and genetic properties of MBL-producing *P. aeruginosa* was examined and, for the first time, the occurrence of *bla*<sub>VIM-2</sub> in multiples copies, within the bacterial genome, is described.

### 4.2.3 Materials and Methods

#### 4.2.3.1 Bacterial strains

Nine clinical isolates resistant to imipenem recovered in the context of the regular screening for metallo- $\beta$ -lactamase producers among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were included in this study. The strains were recovered from different patients from five geographically distinct hospitals located at North and Center of Portugal between 2000 and 2004 (Table 4.1 e 4.2). Identification was carried on using the Vitek system. *P. aeruginosa* HSV3483 strain, dating from 1995, the first VIM-2-producer found in Portugal (Cardoso *et al.*, 2002), the FF-PS2 strain (Quinteira *et al.*, 2005b), and RON-1 strain, previously isolated in France (Poirrel *et al.*, 2001a), were also included in the present study in order to assess their clonal relatedness with isolates of this study and for HSV3483 to characterize the genetic support structure of *bla*<sub>VIM-2</sub>.

#### 4.2.3.2 Antimicrobial agents and susceptibility testing

MICs were determined, for  $\beta$ -lactam antibiotics, by the Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) method. Susceptibility to aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin and netilmicin) and ciprofloxacin was tested by disk diffusion method and results were interpreted according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA*<sub>VIM-2</sub> IN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

Table 4.1: Characteristics of the *bla*<sub>VIM-2</sub>-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates<sup>a</sup>

| Isolate             | Isolation date(year) | Hospital/Geographical location | PFGEProfile <sup>e</sup> | Integrons | Gene cassettes within integron variable region                            | Location of <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> gene<br>Location <sup>d</sup> | Multiplicities  |
|---------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| HSV3483/            | 1995                 | A/North                        | A                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | C/P                                                                   | +               |
| FF-PS1              | 2000                 | D/Center                       | B                        | In102     | ORF11; <i>aacA4</i> ; <i>aacC1</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>          | C                                                                     | +               |
| FF-PS2/             | 2000                 | D/Center                       | C                        | In100     | <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacA4</i> ; <i>blaP1b</i> ; <i>aadA2</i> | C                                                                     | +               |
| HV8                 | 2001                 | E/Center                       | D                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | C                                                                     | +               |
| HV15                | 2001                 | E/Center                       | E                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | C/P                                                                   | +               |
| IP03                | 2001                 | C/North                        | F                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | ND <sup>b</sup>                                                       | ND <sup>b</sup> |
| CB5                 | 2002                 | D/Center                       | G                        | In56      | <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>                                               | ND <sup>b</sup>                                                       | ND <sup>b</sup> |
|                     |                      |                                |                          | In51      | <i>aadA6</i>                                                              | ND <sup>b</sup>                                                       | ND <sup>b</sup> |
| PS35                | 2002                 | B/North                        | H                        | In103     | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacA4</i>                 | ND <sup>b</sup>                                                       | ND <sup>b</sup> |
| PS67                | 2003                 | B/North                        | I                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | ND <sup>b</sup>                                                       | ND <sup>b</sup> |
| PS74                | 2003                 | B/North                        | E                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | C/P                                                                   | +               |
| CB58                | 2004                 | D/Center                       | J                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  | C/P                                                                   | +               |
| RON-1/ <sup>f</sup> | 1998                 |                                | A                        | In58      | <i>aacA7</i> ; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> ; <i>aacC1</i> ; <i>aacA4</i>  |                                                                       |                 |

<sup>a</sup>clones are designated by capital letters; <sup>b</sup>ND, not determined; <sup>c</sup>NK, not known; <sup>d</sup>C, chromosomal; P, plasmidic; <sup>e</sup>Abbreviations: IPM,imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; PIP, piperacillin; piperacillin - tazobactam; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; NET, netilmicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; <sup>f</sup>Source of reference: HSV3483 (Cardoso *et al.*, 2002), FF-PS2 (Quinteira *et al.*, 2005b), RON-1 (Poirel *et al.*, 2001a).

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

Table 4.2: Characteristics of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates<sup>a</sup> (continued...)

| Isolate               | Source             | MIC (µg/ml) <sup>e</sup> |     |       |     |     |      | Non-β-lactam resistance phenotype |                         |                    |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|-----|-------|-----|-----|------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
|                       |                    | IPM                      | MEM | ATM   | CAZ | FEP | PIP  | TZP                               | AMK                     | GEN, NET, TOB, CIP |
| HSV3483/ <sup>f</sup> | Urine              | >32                      | 1   | 8     | 32  | 16  | 256  | 256                               | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| FF-PS1                | Blood              | >32                      | 4   | 2     | 16  | >32 | 16   | 16                                | GEN, NET, TOB           |                    |
| FF-PS2/ <sup>f</sup>  | Blood              | >32                      | >32 | 8     | 32  | >32 | >256 | >256                              | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| HV8                   | Urine              | >32                      | >32 | 2     | 64  | >32 | 16   | 16                                | AMK, GEN, NET, TOB      |                    |
| HV15                  | Urine              | >32                      | >32 | 16    | 64  | >32 | >256 | 128                               | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| IPO3                  | NK <sup>c</sup>    | >32                      | 16  | 16    | 32  | >32 | 32   | 64                                | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| CB5                   | Bronchial aspirate | >32                      | >32 | 8     | 128 | >32 | 64   | 64                                |                         |                    |
|                       | Bronchial aspirate | >32                      | >32 | 8     | 128 | >32 | 64   | 64                                |                         |                    |
| PS35                  | Urine              | 16                       | 8   | 16    | 32  | >32 | 32   | 32                                | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| PS67                  | Catheter           | >32                      | >32 | 8     | 32  | >32 | 16   | 64                                | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| PS74                  | NK <sup>c</sup>    | >32                      | >32 | 0.125 | 64  | >32 | 16   | 32                                | AMK, GEN, NET, TOB, CIP |                    |
| CB58                  | Urine              | >32                      | >32 | 4     | 64  | >32 | 16   | 32                                | AMK, GEN, NET, TOB      |                    |
| RON-1/ <sup>f</sup>   |                    |                          |     |       |     |     |      |                                   |                         |                    |

<sup>a</sup>clones are designated by capital letters; <sup>b</sup>ND, not determined; <sup>c</sup>NK, not known; <sup>d</sup>C, chromosomal; P, plasmidic; <sup>e</sup>Abbreviations: IPM, imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; PIP, piperacillin; piperacillin - tazobactam; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; NET, netilmicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; <sup>f</sup>Source of reference: HSV3483 (Cardoso *et al.*, 2002), FF-PS2 (Quinteira *et al.*, 2005b), RON-1 (Poirel *et al.*, 2001a).

## 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

### 4.2.3.3 Screening of MBL-producing isolates

Isolates were evaluated for MBL production by a bioassay method. Crude extracts were incubated with imipenem disks (10 µg) at 37°C for 30 min before being transferred to the Mueller-Hinton agar plates inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922. Plates were incubated overnight, at 37°C. This experiment was also performed in the presence of 2 mM EDTA in the same conditions described above. An increase in the imipenem disk, containing the crude extract plus EDTA, inhibition zone was interpreted as being suggestive of MBL production.

### 4.2.3.4 Screening of MBL genes

A PCR Multiplex assay was performed in order to detect *bla<sub>VIM</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* genes simultaneously in the same reaction using VIM/IMP primers (Cardoso *et al.*, 2002; Senda *et al.*, 1996a). MBL positive controls were *P. aeruginosa* HSV3763 carrying *bla<sub>VIM-2</sub>* (Cardoso *et al.*, 2002) and *Acinetobacter baumannii* Ac65 carrying *bla<sub>IMP-5</sub>* (Crespo *et al.*, 2004).

### 4.2.3.5 Screening for integrons and sequencing

Class1 integrons were screened in isolates that revealed a band suggestive of the presence of a *bla<sub>VIM</sub>* gene and sequencing was performed in amplified fragments obtained with sets of primers specific for 5'CS and 3'CS (Lévesque *et al.*, 1995) and INT/5CS and INT/3CS (Riccio *et al.*, 2000). The presence of *IntI1* gene, *qacEΔ1* and *su1* genes was performed by PCR, using specific primers (Sandvang *et al.*, 1998). The nucleotide sequence of the integron containing the *bla<sub>VIM</sub>* gene was determined through a primer-walking strategy (using specific designed primers).

### 4.2.3.6 Plasmid DNA content analysis and conjugation assays

Extraction of plasmid DNA was carried out using the Qiagen Plasmid Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Transfer of resistance genes was screened by mating, using rifampicin-resistant *P. aeruginosa* strain PAO or rifampicin-resistant *Escherichia coli* strain K802N. Transconjugant

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

selection was performed in Mueller-Hinton agar plates containing rifampicin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) and amoxicillin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) or imipenem (2  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.2.3.7 Southern and I-CeuI techniques

To search for a possible chromosomal location of the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene, digestion with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease, specific for rRNA genes, was performed (Liu *et al.*, 1993).

Briefly, plugs of bacteria presenting VIM-2  $\beta$ -lactamase were prepared and digestion with I-CeuI (New England Biolabs, Hertfordshire, United Kingdom) occurred overnight. After digestion, separation of the resulting fragments was performed by PFGE with a CHEF-DRIII apparatus. Endonuclease I-CeuI-generated DNA fragments of the studying strains were subsequently transferred onto a nylon membrane (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech) by the Southern technique and were UV cross-linked for 2 min. Three different probes were used to hybridize with those obtained fragments: a 1504 bp PCR-generated probe for 16S and 23S rRNA genes (Héritier *et al.*, 2003), a 815 bp PCR-generated probe (Cardoso *et al.*, 2002) for detection of the *bla<sub>VIM</sub>* genes, and a 898 bp PCR-generated probe for detection of *IntI1* (classe 1 integrase) gene (Kern *et al.*, 2002). Labeling and revelation were performed according to the manufacturer's instructions of the ECLTM Random prime labelling and detection systems (Amersham Life science). *E. coli* K12 and some *bla<sub>VIM</sub>*-negative strains were also used as controls.

Also, *bla<sub>VIM</sub>* probe was hybridized to a southern blot of RFLP fragments, obtained after genomic digestion with BamHI restriction enzyme.

#### 4.2.3.8 Chromosomal DNA analysis by PFGE

Typing was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Xba*I- and *Spe*I-restricted genomic DNA as described previously (Gautom, 1997). Plug slices of the samples were loaded and electrophoresed in 1% Seakem Gold agarose with standard 0.5x TBE running buffer. The electrophoresis was performed with a CHEF-DRIII (Bio-Rad) apparatus at 200 V for 20 h, with pulse times ranging from 1 to 20 s when using *Xba*I. The migration conditions, when *Spe*I was em-

## 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

ployed, were as follows: 200 V for 24 h, with 2 linear switch ramps of 5 15 s for 12 h and 15 45 s for an additional 12 h. Macrorestriction fragments were visually compared and interpreted according to the criteria of Tenover *et al.* (1995).

### 4.2.3.9 Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying integrons reported in this paper have been submitted to the EMBL/GenBank sequence databases and assigned under accession number AY775051 for *P. aeruginosa* FF-PS1, and AY954726 for *P. aeruginosa* PS35.

## 4.2.4 Results

### 4.2.4.1 Characteristics of the VIM-2-producing *P. aeruginosa* isolates

MBL screening tests were positive in the 9 isolates of *P. aeruginosa* and *bla<sub>VIM</sub>* was the only MBL gene detected. Sequencing revealed that all isolates presented a *bla<sub>VIM</sub>*.

These *P. aeruginosa* were recovered from different products (1 blood samples, 5 urines, 1 bronchial aspirate, 1 catheter, and two unknown products) and patients, collected from five hospitals located in North (Hospital A, B, and C) and Center of Portugal (Hospital D and E). The main characteristics of the VIM-2 producers and the MICs of seven antipseudomonal  $\beta$ -lactams are resumed in Table 4.1 and 4.2. All isolates were resistant to imipenem and cefepime. Reduced susceptibility to ceftazidime and meropenem was observed in all isolates although for the later one, susceptibility was observed in two isolates. Variable susceptibility to aztreonam, piperacillin, and piperacillin-tazobactam was also observed. Most of the isolates were resistant to ciprofloxacin and to aminoglycosides.

### 4.2.4.2 Clonal diversity of *P. aeruginosa* isolates

PFGE of *Xba*I- and *Spe*I-digested genomic DNA from *bla<sub>VIM-2</sub>*-positive *P. aeruginosa* resulted in 10 distinct genomic fingerprints among the 12 examined isolates (Figure 4.2; Table 4.1 and 4.2). Interestingly, the oldest isolate, dating from 1995, showed similarity with RON-1 strain isolated in 1998 in France (Poirel

*et al.*, 2001a), differing in their macrorestriction profile obtained with *SpeI* and *XbaI* by 4 and 0 bands, respectively. Two other isolates derived from geographically distant hospitals, and recovered with an interval of two years, also displayed indistinguishable PFGE patterns by *XbaI* and differed by 3 bands when digested with *SpeI*, suggesting clonal relatedness (Figure 4.2).

#### 4.2.4.3 Structure of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-containing integrons

Five *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying integrons presenting distinct gene cassettes organization were observed (Figure 4.3). The positions of *bla<sub>VIM-2</sub>* gene cassette varied among integrons, and almost all also presented genes coding for aminoglycoside modifying enzymes.

The majority (n=7) of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-producing *P. aeruginosa* isolates (including the oldest strain, HSV3483) presented this gene as part of a gene cassette inserted into a class 1 integron identical to In58 described by Poiriel *et al.* (2001a). The variable region of this integron contained four gene cassettes, including an *aacA7*, a *bla<sub>VIM-2</sub>*, an *aacC1*, and an *aacA4* cassettes.

*P. aeruginosa* CB5 presented the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene as a sole gene cassette inserted in an integron that revealed homology with the previously described In56 (Poiriel *et al.*, 2000b). Additionally, this isolate possessed another class 1 integron, identical to In51 (Naas *et al.*, 1999), which carried the *aadA6* gene cassette.

Apart from the recently described In100 (Quinteira *et al.*, 2005b), two other new *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying class 1 integrons (In102 and In103), presenting an original gene cassette organization, were observed in isolates without genomic relatedness.

The variable region of In102 integron contained an *aacA4* gene cassette immediately downstream of an 11-aminoacid ORF (ORF11), an *aacC1* cassette, and the *bla<sub>VIM-2</sub>* gene cassette. Within the integrase gene, a hybrid-type Pc promoter (-35 [TGGACA]; -10 [TAAACT]) and a P2 promoter, in its inactive form (Collis & Hall, 1995; Fluit & Schmitz, 1999), were identified.

The structure of In103 from PS35 isolate was similar to In58, although, in the former, the *aacC1* gene cassette was absent. The promoter region presented a strong Pc promoter (-35 [TTGACA]; -10 [TAAACT]) configuration and a weak P2 promoter (Collis & Hall, 1995; Fluit & Schmitz, 1999).

The gene cassettes containing genes coding for aminoglycoside-modifying

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *bla*<sub>VIM-2</sub> IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

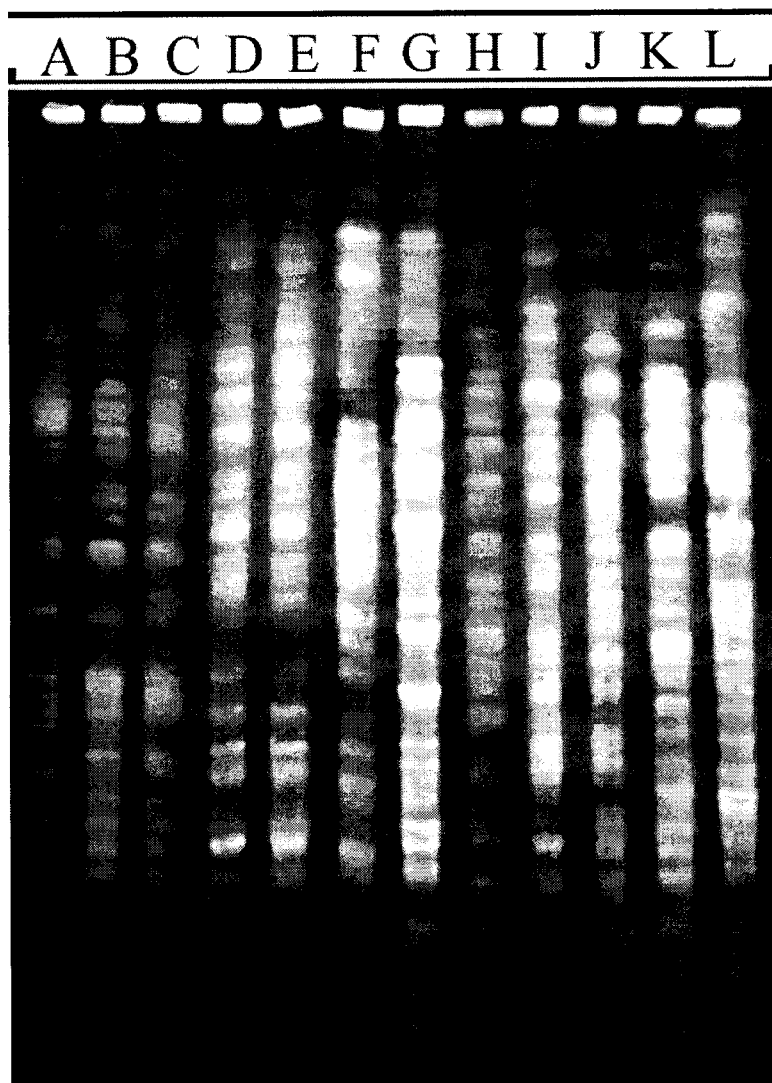


Figure 4.2: PFGE patterns, of *Spe*I-digested genomic DNA, of *bla*<sub>VIM-2</sub>-positive *P. aeruginosa* isolates. A, isolate FF-PS2; B, isolate HSV3483; C, isolate RON-1 isolate; D, HV15 isolate; E, PS74 isolate ; F, HV8 isolate; G, PS35 isolate; H, PS67 isolate; I, CB58 isolate; J, CB5 isolate; K, IPO3 isolate; L, FF-PS1 isolate

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

enzymes, repeatedly found (*aacA4*, *aacC1*, and *aacA7*), revealed identity among them, with the exception of the *aacA4* gene cassette carried in In100. In this case, a different *aac(6')-Ib'* with a substitution aspartate-171 to valine was observed, as well as additional 24 nucleotides inserted upstream the initiation codon.

#### 4.2.4.4 Genetic support of *bla<sub>IMI-2</sub>* and class 1 integrons

Conjugation experiments failed to demonstrate the occurrence of conjugative transfer of  $\beta$ -lactamase determinants from our strains to rifampicin-resistant *P. aeruginosa* PAO or *E. coli* K802N strains. I-*CeuI* technique (Liu *et al.*, 1993) and hybridization with *bla<sub>IMI</sub>* and rRNA probes was performed in order to determine whether *bla<sub>IMI-2</sub>* was plasmid or chromosomally located (See Figure 4.4 for examples). Four fragments were generated with I-*CeuI*-restricted DNAs for almost all *P. aeruginosa* while seven fragments were obtained from the *E. coli* K-12 reference strain. Interestingly, for the 7 isolates where this technique was applied, various signals were obtained with the *bla<sub>IMI</sub>* and the *IntI1* specific probes and were correspondent to those obtained with hybridization with the 16S ribosomal DNA-specific probe, thus indicating that the *bla<sub>IMI-2</sub>* gene was present in multiple copies in the *P. aeruginosa* isolates genome. A signal was obtained with the *bla<sub>IMI</sub>*-specific probe that did not correspond to none of the bands that hybridized with the 16S rDNA-specific probe in 4 isolates, thus suggesting a plasmid location. In all these four isolates, the associated *bla<sub>IMI-2</sub>*-carrying integron was In58. From these, three isolates presented a similar plasmidic band (inferior to 40 Kbp in HV15, Ps74 and CB58 *P. aeruginosa* isolates, as estimated by comparison with I-*CeuI*-fragments of *E. coli* K12 DNA) while isolate HSV3483 presented a larger plasmid (c.a. 60 kbp). Plasmid DNA was also detectable by agarose gel electrophoresis in plasmid preparation from these four strains.

When a *bla<sub>IMI</sub>* probe was hybridized to a Southern blot of RFLP fragments obtained with *BamHI*, multiple copies were also observed, reconfirming the multicopy profile of that genetic determinant (Figure 4.4).

4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *bla<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

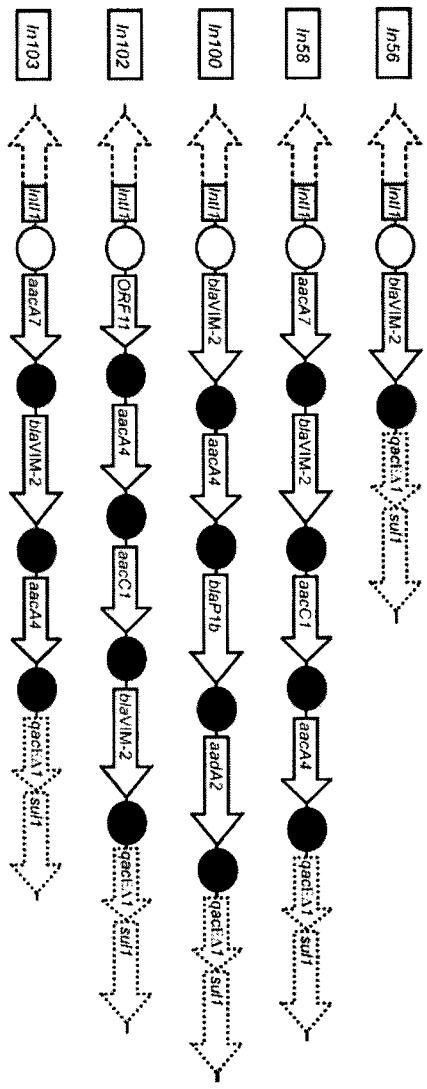


Figure 4.3: Schematic representation of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying class I integrons of *P. aeruginosa* clinical isolates included in this study. In56 (AF191564), In58 (AF263520), In100 (AY560837), In102 (AY775051), and In103 (AY775051)

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO



Figure 4.4: Two examples of the localization of *bla<sub>VIM-2</sub>* in I-CeuI-generated fragments of two *P. aeruginosa*: (1) HSV3483 isolate; (2) FF-PS2 isolate. (A) Chromosome restriction patterns. (B) Hybridization of restricted patterns with a probe specific to 16S rRNA genes. (C) Hybridization of restricted fragments with a probe specific to the *bla<sub>VIM</sub>* gene. (D) Hybridization of restricted fragments with a probe specific to the *intI1* integrase gene. (E) Hybridization of RFLP fragments obtained with *Bam*HI with a probe specific to the *bla<sub>VIM</sub>* gene

## 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

### 4.2.5 Discussion

Metallo- $\beta$ -lactamases are emerging worldwide as acquired resistance determinants among clinical isolates of Enterobacteriaceae and non-fermenter species, a fact that can be considered one of the most worrisome developments in the field of bacterial resistance.

In Portugal, since the first isolated clinical *bla<sub>VIM-2</sub>*-producing *P. aeruginosa*, collected in 1995 (Cardoso *et al.*, 2002), several carbapenemase producers of different species have been observed not only in clinical samples (Conceição *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2002; Quinteira *et al.*, 2005b, , A. Duarte, A. Brizio, F. Grosso, T. Conceição, and G. Da Silva, Abstr. 43rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C2-2024, 2003), but also in a hospital sewage sample (Quinteira *et al.*, 2005a). The ongoing spread of *bla<sub>VIM-2</sub>*, the most prevalent MBL in our country, is currently occurring, in clinical isolates, with a high geographical dispersion (Peixe, L., unpublished data), already reported in *P. aeruginosa* (Cardoso *et al.*, 2002; Quinteira *et al.*, 2005b), *Klebsiella oxytoca* (Conceição *et al.*, 2005) and in *P. pseudoalcaligenes* (Quinteira *et al.*, 2005a).

Three non-exclusive hypotheses, dealing with very distinct levels of resolution, may help explain the dissemination of VIM-2 within the Portuguese territory: clonal dissemination (i), *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying integron dissemination (ii), and *bla<sub>VIM-2</sub>* gene cassette dissemination (iii).

#### 4.2.5.1 Clonal dissemination

Supporting the first hypothesis (clonal dissemination) there is evidence showing that related strains are being isolated, in different years, in distinct geographical locations. Circumstantial evidence of VIM-2 carrying bacteria clonal spreading may be found in the fact that the related strains HV15 and Ps74 were recovered from different hospitals within Portugal [Hospital E in the Center region (2001) and Hospital B in the North region (2003), respectively]. An even more extreme example can be viewed in the fact that HSV3483 and RON-1 were isolated in different countries [Portugal (1995) and France (1998)]. As France has a great Portuguese community of emigrants that periodically return to their home country, it is tempting to speculate that the In58-carrying strain has spread between the

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

two countries. Previously, an OXA-40 *A. baumannii* producer [a strain already disseminated in the Iberian Peninsula (Da Silva *et al.*, 2002)] was described in a Portuguese patient attending a hospital in France. These observations raise the possibility that VIM-2-producing *P. aeruginosa* strains may be carried by patients, for a sufficiently prolonged period of time, thus promoting dissemination in different countries. Also, other reports from the Far East and some European countries, have shown that VIM-1 and VIM-2 MBLs are frequently detected among clonally related *P. aeruginosa* (Cornaglia *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2003; Tsakris *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2001b).

#### 4.2.5.2 Integron dissemination

Besides the clonal spreading mentioned above, there is also evidence of dissemination of specific integrons (*bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integron dissemination). This seems to be the case with In58, an integron widely diffused, present in seven *P. aeruginosa* isolates collected in different Portuguese hospitals over a long time period (dating from at least 1995). Dissemination of plasmids carrying this integron seems to contribute to its high prevalence, as the hybridization of VIM-2 probe with plasmidic bands suggest. In56 might be considered an even more interesting example since it has been simultaneously described in *P. aeruginosa* and *P. pseudoalcaligenes* (Quinteira *et al.*, 2005a), within two different environments. Furthermore, the variable region of the *bla*<sub>VIM-2</sub>-containing integron (named In103) of PS35 is clearly related, although not identical, to that of In58, suggesting that In103 could have derived from In58 following excision of the *aacC1*-containing cassette. These data support the hypothesis already suggested by several authors (Gombac *et al.*, 2002; Martinez-Freijo *et al.*, 1999) that resistance genes are transferred often as part of the entire integron structure. Also, the presence, in these integrons, of gene cassettes, conferring resistance to the antibiotics currently used in *P. aeruginosa* infections, may account for their persistence.

#### 4.2.5.3 *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassette dissemination

Finally, it may also be argued that the dissemination of VIM-2 is mainly a result of the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassette spreading. Although the mechanisms that explain

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

integron size and structure are still poorly understood, evidence points to the fact that rearrangements and integration/excision of gene cassettes affect the integron structure (Collis & Hall, 1995; Fluit & Schmitz, 1999). Integrons such as In102, with known genes sorted in a novel arrangement, can be viewed as hypothetical examples of cassette mobility. Furthermore, since gene cassettes present the potential to move within or between integrons, then it could be expected that integron structure has the potential to reflect the result of distinct selective pressures. Novel gene cassettes are preferentially inserted at 5'-CS region of the integron, thus assuring a stronger expression, forming a queue that ranges from the newest to the oldest inserted cassette (Collis *et al.*, 2001; Partridge *et al.*, 2000). This gene cassette lineup, as seems to be the case of the recently characterized In100 (Quinteira *et al.*, 2005b), seems to reflect the evolution of antibiotic usage in therapeutics.

Additionally, two clonally related strains presenting an *aadA6*-carrying class 1 integron, identical to In51 (Naas *et al.*, 1999), were recovered within the same medical ward, in two hospitalized patients. Curiously, one of those strains (CB5) additionally presented a *bla<sub>VIM-2</sub>* carrying integron (In56), a fact that might be viewed as a recent acquisition, related with a specific antibiotic pressure.

The end result of VIM-2 dissemination does not seem to be confined to the acquisition of resistance by previously susceptible bacteria. In this work, multiple copies of *bla<sub>VIM-2</sub>* and IntI1 were observed dispersed throughout the chromosome and sometimes also in plasmids. Thus, the dissemination of these genetic elements occurs over the bacterial genome, hypothetically allowing for a higher expression of the enzyme. Interestingly, this observation doesn't seem to be restricted to *P. aeruginosa* since the presence of *bla<sub>VIM-2</sub>* (inside In56 class 1 integron) in multiple copies was also detected in a *P. pseudoalcaligenes* environmental strain (data not shown). Although integrons themselves are not mobile, several class 1 integrons have been found in Tn21 and Tn21-related transposons (Fluit & Schmitz, 1999; Yatsuyanagi *et al.*, 2004a). Since some class 1 integrons carrying MBL genes have already been associated to Tn5051-type transposon (Toleman *et al.*, 2003)), a similar association of the *bla<sub>VIM-2</sub>*-carrying integrons described in this study cannot be ruled out.

Although alternative interpretations to some of the presented examples might eventually arise, a summary of all collected evidence demonstrated that VIM-2 dissemination is a final result of distinct spreading processes, simultaneously

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

acting within very distinct levels of complexity, from bacteria to gene cassettes.

#### 4.2.6 Acknowledgments

We would like to thank to all who have contributed isolates to this study: José Amorim, Helena Ramos, Paula Silva, Maria Augusta Guimarães, Elisabete Fernandes, José Miguel Pereira, Graça Ribeiro, and Clementina Vital. We also thank Laurent Poirel and Patrice Nordmann for kindly providing *P. aeruginosa* RON-1. We are also grateful to Nuno Monteiro for helpful discussions and critical review of the manuscript. Sandra Quinteira is a PhD student from Programa PRODEP.

#### 4.2.7 References

- BAHAR, G., MAZZARIOL, A., KONCAN, R., MERT, A., FONTANA, R., ROSSOLINI, G. M. & CORNAGLIA, G., 2004. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 282–283.
- CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.
- CASTANHEIRA, M., TOLEMAN, M., JONES, R., SCHMIDT, F. & WALSH, T., 2004. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4654–4661.
- COLLIS, C. M. & HALL, R. M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 155–162.
- COLLIS, C. M., RECCHIA, G. D., KIM, M.-J., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA*<sub>VIM-2</sub> IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

integrase. *International Journal of Bacteriology* **183**: 2535–2542.

CONCEIÇÃO, T., BRÍZIO, A., DUARTE, A. & BARROS, R., 2005. First isolation of bla<sub>VIM-2</sub> in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 476.

CORNAGLIA, G., MAZZARIOL, A., LAURETTI, L., ROSSOLINI, G. M. & FONTANA, R., 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-β-lactamase. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 1119–1125.

CRESPO, M. P., WOODFORD, N., SINCLAIR, A., KAUFMANN, M. E., TURTON, J., GLOVER, J., VELEZ, J. D., CASTAÑEDA, C. R., RECALDE, M. & LIVERMORE, D. M., 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-β-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5094–5101.

DA SILVA, G. J. D., CORREIA, M., VITAL, C., RIBEIRO, G., SOUSA, J. C., LEITÃO, R., PEIXE, L. & DUARTE, A., 2002. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 33–39.

FLUIT, A. C. & SCHMITZ, F. J., 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* **18**: 761–770.

GAUTOM, R., 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2977–2980.

GIAKKOUPI, P., PETRIKKOS, G., TZOUVELEKIS, L. S., TSONAS, S., THE WHONET GREECE STUDY GROUP, LEGAKIS, N. J. & VATOPOULOS, A. C., 2003. Spread of integron-associated VIM-type metallo-β-lactamase genes among

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 822–825.

GOMBAC, F., RICCIO, M., ROSSOLINI, G., LAGATOLLA, C., TONIN, E., MONTI-BRAGADIN, C., LAVENIA, A. & DOLZANI, L., 2002. Molecular characterization in integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 3665–3668.

HÉRITIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 268–273.

KERN, M. B., KLEMMENSEN, T., FRIMODT-MOLLER, N. & ESPERSEN, F., 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**: 513–516.

LAURETTI, L., RICCIO, M. L., MAZZARIOL, A., CORNAGLIA, G., AMICOSANTE, G., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G. M., 1999. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1584–1590.

LEE, K., LIM, J. B., YUM, J. H., YONG, D., CHONG, Y., KIM, J. M. & LIVERMORE, D. M., 2002. *bla<sub>VIM-2</sub>* cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1053–1058.

LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C. & ROY, P. H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 185–191.

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *BLA<sub>VIM-2</sub>* IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

LIU, S.-L., HESSEL, A. & SANDERSON, K. E., 1993. Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 6874–6878.

LIVERMORE, D. M., 1992. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 2046–2048.

MARTINEZ-FREIJO, P., FLUIT, A. C., SCHMITZ, F.-J., VERHOEF, J. & JONES, M. E., 1999. Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 686–689.

MENDES, R., CASTANHEIRA, M., GARCIA, P., GUZMAN, M., TOLEMAN, M., WALSH, T. & JONES, R., 2004. First isolation of *bla<sub>VIM-2</sub>* in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1433–1434.

MENDES, R., TOLEMAN, M., RIBEIRO, J., SADER, H., JONES, R. & WALSH, T., 2004. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>IMP-16</sub>*, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4693–4702.

NAAS, T., POIREL, L. & NORDDMANN, P., 1999. Molecular characterization of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyl-transferase gene cassette, *aadA6*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1489**: 445–451.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informa-

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

tional supplement M100-S12. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

PALLECCHI, L., RICCIO, M., DOCQUIER, J., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G., 2001. Molecular heterogeneity of bla(VIM-2)-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters* **195**: 145–50.

PARTRIDGE, S. R., RECCHIA, G. D., SCARAMUZZI, C., COLLIS, C. M., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* **146**: 2855–2864.

PASTERAN, F., FACCONI, D., PETRONI, A., RAPOPORT, M., GALAS, M., VÁZQUEZ, M. & PROCOPIO, A., 2005. Novel variant (*bla*<sub>VIM-11</sub>) of the metallo-β-lactamase *bla*<sub>VIM</sub> family in a GES-1 extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 474–475.

POIREL, L., LAMBERT, T., TÜRKÖGLÜ, S., RONCO, E., GAILLARD, J.-L. & NORDMANN, P., 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing β-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 546–552.

POIREL, L., NAAS, T., NICOLAS, D., COLLET, L., BELLAIS, S., CAVALLO, J.-D. & NORDMANN, P., 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 891–897.

POURNARAS, S., MANIATI, M., PETINAKI, E., TZOUVELEKIS, L. S., TSAKRIS, A., LEGAKIS, N. J. & MANIATIS, A. N., 2003. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-β-

#### 4.2. MULTI-LAYERED DISSEMINATION PROCESSES OF *bla*<sub>VIM-2</sub> IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATES

---

lactamase gene variants *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>VIM-4</sub>. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 1409 – 1414.

POURNARAS, S., TSAKRIS, A., MANIATI, M., TZOUVELEKIS, L. S. & MANIATIS, A. N., 2002. Novel variant (*bla*<sub>VIM-4</sub>) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>VIM-1</sub> in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 4026–4028.

QUINTEIRA, S., FERREIRA, H. & PEIXE, L., 2005a. First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2140–2141.

QUINTEIRA, S., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005b. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 451–453.

RICCIO, M. L., FRANCESCHINI, N., BOSCHI, L., CARAVELLI, B., CORNAGLIA, G., FONTANA, R., AMICOSANTE, G. & ROSSOLINI, G. M., 2000. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1229–1235.

SANDVANG, D., AERESTRUP, F. M. & JENSEN, L. B., 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 37–41.

SENDA, K., HARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA., M., 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>IMP</sub>) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D. & SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting chromosomal

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233–2239.

TOLEMAN, M. A., BIEDENBACH, D., BENNETT, D., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2003. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-13</sub>, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 583–590.

TOLEMAN, M. A., ROLSTON, K., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2004. *bla*<sub>VIM-7</sub>, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 329–332.

TOLEMAN, M. A., SIMM, A. M., MURPHY, T. A., GALES, A. C., BIEDENBACH, D. J., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 673–679.

TSAKRIS, A., POURNARAS, S., WOODFORD, N., PALEPOU, M.-F. I., BABI, G. S., DOUBOYAS, J. & LIVERMORE, D. M., 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 329–332.

YAN, J. J., HSUEH, P.-R., KO, W.-C., LUH, K.-T., TSAI, S.-H., WU, H.-M. & WU, J.-J., 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2224–2228.

YATSUYANAGI, J., SAITO, S., HARATA, S., SUSUKI, N., ITO, Y., AMANO, K. & ENOMOTO, K., 2004. Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 626–628.

#### 4.3. CONTEXTO GENÉTICO DO GENE *BLA<sub>VIM-2</sub>* (RESULTADOS PRELIMINARES)

---

### 4.3 Contexto genético do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* (resultados preliminares)

Aquando do estudo da localização do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* em isolados de *P. aeruginosa* que continham este determinante de resistência, e utilizando técnicas de hibridação (técnica da I-CeuI e digestão com BamHI) (consultar Anexo), foi possível observar que em algumas bactérias, o gene apresentava um localização cromossômica, e noutras plasmídica. Curiosamente, em alguns casos, foi também possível, e pela primeira vez, identificar múltiplas cópias do gene no cromossoma e simultaneamente em cromossoma e plasmídeo. Este facto suscitou grande interesse, pois poderia ser uma explicação para a baixa expressão do gene quando clonado. Além disso, foi possível verificar que essa localização em múltiplas cópias também se revelava para o gene da integrase dos integrões de classe 1, o que fez supor que quer o gene quer o integrão, ao qual estava associado, se encontrariam em várias cópias no genoma bacteriano.

Por forma a tentar comprovar esta localização em múltiplas copias, procedeu-se à tentativa de caracterização das sequências nucleotídicas adjacentes ao local de inserção dos integrões de class 1 contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, utilizando uma aproximação baseada na metodologia proposta por Sorensen *et al.* (1993), descrita em no Material e Métodos (em Anexo).

Os primeiros resultados obtidos, ainda que muito preliminares, a partir da análise das sequências nucleotídicas mostram uma homologia com o gene *tnpM*, apontando para uma associação do integrão contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* a um transposão do tipo Tn5051, à semelhança do já descrito por Toleman *et al.* (2005). Esta associação poderá constituir uma das explicações para a existência do integrão e respectivo gene em múltiplas cópias.

Estão em curso estudos que permitirão a clarificação desta associação.

### 4.4 Outros resultados não incluídos em publicações

Para além dos isolados caracterizados no sub-capítulo "Multi-layered dissemination processes of *bla<sub>VIM-2</sub>* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates", posteriormente foram encontrados mais três isolados clínicos de *P. aeruginosa* (um do

EPIDEMIOLOGIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, DE ORIGEM  
HOSPITALAR, PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES.  
CARACTERIZAÇÃO DAS CARBAPENEMASES, DAS UNIDADES DE  
CAPTURA GENÉTICA ASSOCIADAS E SUA LOCALIZAÇÃO

---

HGSA, um dos HUC e um do HST) contendo o gene *bla<sub>IMI-2</sub>*. O isolado Cb19 dos HUC apresentava o gene como uma única cassette num integrão idêntico ao In56. Nos outros dois isolados o gene localiza-se num integrão idêntico ao In58, também ele o mais prevalente nos isolados estudados.

#### 4.4. OUTROS RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS EM PUBLICAÇÕES

---

## Capítulo 5

### Discussão Geral

Nos últimos anos, o debate sobre a resistência aos carbapenemos em bacilos de Gram negativo, nomeadamente em patógenos nosocomiais oportunistas, emergiu como um fenómeno capaz de criar simultaneamente interesse e preocupação, visto que este grupo particular de antibióticos constituirá, em muitas situações, a única opção terapêutica no tratamento de infeções graves. Vários são os mecanismos responsáveis pela emergência de bactérias resistentes aos carbapenemos, sendo a produção de carbapenemases um dos mais preocupantes, uma vez que estas enzimas eficientemente hidrolisam não só carbapenemos mas também  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, determinando, assim, com frequência assinalável, recorrentes insucessos terapêuticos. Adicionalmente, os genes que codificam estas enzimas encontram-se, por vezes, associados a elementos genéticos móveis facilitadores de um processo, que se antevê contínuo, de disseminação.

Em Portugal, existem já descrições de isolados hospitalares produtores de carbapenemases (ver Da Silva *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2002; Conceição *et al.*, 2005). No entanto, estudos que versem especificamente a existência de carbapenemases em novos nichos ecológicos eram, até ao início do presente trabalho, inexistentes, factor que intensifica a necessidade urgente de criação de novas abordagens científicas que definitivamente transponham as fronteiras hospitalares, englobando ecossistemas que se sabem interligados, mas estruturalmente tão distintos como hospitais, comunidade em geral e, sobretudo, ambiente natural.

---

Actualmente, um dos nichos ecológicos mais importantes, promotor do aparecimento de elevados níveis de resistências é, indubitavelmente, o ambiente hospitalar. Aí, resultado quer da aglomeração física, num espaço limitado, de um elevado número de pacientes com diferentes infecções, quer da utilização frequente de agentes antimicrobianos durante o processo terapêutico, surgem, a um ritmo crescente, estirpes bacterianas com novos, e elevados, níveis de resistência, fruto de mecanismos próprios de adaptação a um ambiente selectivo e hostil. Veja-se, como exemplo simultaneamente ilustrativo e actual, o caso específico da reutilização da colistina no tratamento de infecções por isolados multi-resistentes de bacilos de Gram-negativo não-fermentadores, particularmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. O comportamento de isolados de *Acinetobacter* spp. justificou a inclusão da colistina em estudos de susceptibilidade, tendo-se demonstrado que, embora a sua utilização, no Hospital Geral de Santo António, date apenas desde 2003, 7,2% dos isolados apresentavam já resistência. Com efeito, no presente trabalho, foi possível verificar a existência de um elevado número de estirpes bacterianas clínicas multi-resistentes, incluindo aos carbapenemos, pertencentes a duas espécies clinicamente relevantes, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. A pesquisa de enzimas capazes de hidrolisar estes antibióticos realizada nos isolados provenientes dos hospitais em estudo, Hospital Geral de Santo António (HGSA) e Instituto Português de Oncologia (IPO), no Porto, Hospital de S. Teotónio (HST), em Viseu, e Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), permitiu identificar a presença de uma metalo- $\beta$ -lactamase do tipo VIM (VIM-2) em vários isolados de *P. aeruginosa*. Esta enzima, inicialmente encontrada em países do sul da Europa, mas actualmente amplamente disseminada, foi a única encontrada em isolados clínicos portugueses, não tendo sido identificada nenhuma enzima do tipo IMP ou SPM-1. Verificou-se que o gene que codifica esta enzima se encontra maioritariamente associado a um integrão de classe 1, designado In58, que para além da *bla<sub>VIM-2</sub>* contém ainda cassetes de genes (*aacA7*, *aacC1* e *aacA4*) que codificam a resistência a vários aminoglicosídeos, correntemente utilizados em combinação com  $\beta$ -lactâmicos no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Verificou-se ainda, para além deste integrão, a associação do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* a integrões com organizações distintas, tendo sido assim descritos e caracterizados pela primeira vez três novos integrões de classe 1 contendo este gene, agora denominados In100, In102 e In103 (números de acesso no GenBank:

AY560837, AY775051 e AY954726, respectivamente).

A região variável do integrão In103 apresenta três cassetes de genes (*aacA7*, *bla<sub>VIM-2</sub>* e *aacA4*) e, embora não idêntica, relaciona-se claramente com a do In58, sugerindo que o integrão In103 possa ter derivado do In58 após uma excisão da cassette contendo o gene *aacC1*. Por seu lado, o integrão In102 apresenta uma organização ligeiramente diferente do anterior, contendo, no entanto, cassetes de genes idênticas: ORF11, *aacA4*, *aacC1* e *bla<sub>VIM-2</sub>*.

O integrão In100 mereceu, neste trabalho, uma particular atenção devido à sua estrutura particular (*bla<sub>VIM-2</sub>*, *aacA4*, *blaP1b*, *aadA2*). Muitos integrões contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* apresentam geralmente duas ou mais cassetes de genes, mas esta foi a primeira vez em que se descreveu um integrão contendo um gene que codifica uma MBL e, simultaneamente, um gene codificador de uma outra  $\beta$ -lactamase. A estrutura genética deste novo integrão revela um arranjo de cassetes de genes que reflecte a evolução sequencial da história do uso de antibióticos (Figura 5.1). Assim, a cassette com o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* foi encontrada na primeira posição do integrão, facto que traduzirá a sua mais recente aquisição. A segunda cassette contém o gene *aacA4*, uma associação bastante comum em integrões que apresentam genes de MBLs. Segue-se o gene *blaP1b* que codifica a PSE-1 que, embora descrita como a  $\beta$ -lactamase adquirida mais comum em isolados de *P. aeruginosa*, nunca antes tinha sido associada a uma outra  $\beta$ -lactamase no mesmo integrão. A quarta e última cassette presente nesta estrutura contém o gene *aadA2* que codifica resistência à estreptomicina, um dos primeiros agentes clinicamente disponíveis. Uma vez que as cassetes de genes mais recentes tendem a ser preferencialmente inseridas na região 5'CS do integrão, assegurando, assim, uma maior expressão, forma-se uma sequência que varia desde a cassette mais recente até à mais antiga. A disposição das cassetes, pelo menos no integrão In100, sugere a evolução da utilização dos antibióticos na terapêutica de infecções por *P. aeruginosa*. Esta hipótese, de que a estrutura dos integrões poderá conter informação específica que traduz a história do uso de antibióticos em determinada espécie ou região, se futuramente corroborada por observações similares, alargará certamente a importância de estudos similares, conferindo-lhes uma nova perspectiva, transformando-os em valiosas "ferramentas históricas", extravasando o domínio da microbiologia clássica, inserindo-se no âmbito da paleobiologia.

Em Portugal, apesar de reconhecida por profissionais de saúde, a noção da

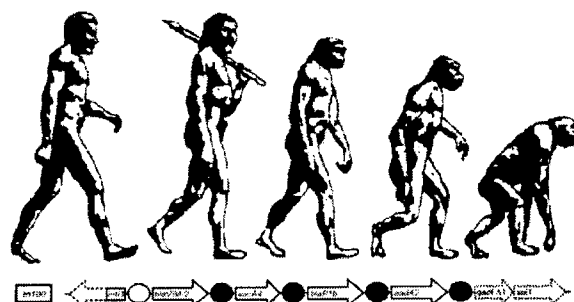


Figura 5.1: Estrutura do integrão In100, reflectindo a história da antibioterapia

existência de endemicidade hospitalar de bactérias multi-resistentes, e respectiva mortalidade associada, só esporadicamente transparece para a opinião pública, geralmente ocorrendo após a morte de doentes que sucumbem a infecções por patogénicos supostamente adquiridos nos hospitais.

Um dos hospitais incluídos no presente trabalho tem vindo, nos últimos anos, a lidar com uma situação recorrente de permanência de isolados de *Acinetobacter* spp. multi-resistentes responsáveis por surtos infecciosos em vários serviços. O estudo dos isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenemo, do HGSA, permitiu constatar a endemicidade de dois clones de *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes, um deles produtor de uma carbapenemase (OXA-40), que persistem pelo menos desde 2001. Os resultados obtidos a partir da análise de PFGE com vários isolados de *Acinetobacter* spp. permitiram verificar que este clone, possuidor do gene *bla<sub>OXA-40</sub>*, não só se encontra amplamente disseminado neste hospital, ao longo de vários serviços médicos, como também noutros hospitais portugueses, desde pelo menos 1995. A distribuição deste clone é, na verdade, geograficamente bem mais ampla, podendo ser encontrado também em Espanha, o que faz supor que possua, para além da multi-resistência aos antibióticos, outras vantagens adaptativas de sobrevivência, demonstrando ainda facilidade de disseminação inter-hospitalar. Curiosamente, o isolado de *A. baumannii* produtor de OXA-40, descrito por Héritier *et al.* (2003) que foi obtido de um doente

português hospitalizado em França, é também geneticamente relacionado com este clone, facto que vem levantar a possibilidade de estirpes produtoras destas enzimas clinicamente relevantes poderem ser transportadas por doentes por um período de tempo suficientemente alargado que promova a sua disseminação em diferentes países.

Surpreendentemente, durante o decorrer do presente trabalho, foi observada a presença da enzima OXA-40 numa espécie bacteriana onde não havia ainda sido descrita, em *Acinetobacter haemolyticus*. Este facto, de indubitável relevância clínica, merecerá futuramente uma abordagem específica que permita compreender qual o processo que terá mediado a transferência desta enzima ou, de uma forma mais ampla, a "história vital" da enzima OXA-40.

As cada vez mais amplas oportunidades de transferência de resistências ao longo dos vários nichos ecológicos corroboram a necessidade de uma utilização mais criteriosa dos antibióticos, salientando e justificando, paralelamente, a necessidade urgente de estudos alargados sobre a disseminação das carbapenemases com relevância clínica e sua pesquisa em bactérias provenientes de ambientes extra hospitalares. Na verdade, parece hoje impor-se uma nova visão, ecológica, que contemple e preveja os vários níveis de interações e relações entre organismos/unidades de captura genética e nichos que ocupam. Assim, procedeu-se à pesquisa de enzimas com capacidade de hidrólise sobre os carbapenemos em bactérias de esgotos, rios, humanos saudáveis da comunidade, amostras de ambulatório e animais. Os resultados obtidos permitiram, pela primeira vez, a identificação de isolados produtores destas enzimas em ambiente não hospitalar, sendo de salientar o facto de se terem encontrado dois isolados de *P. aeruginosa*, provenientes do meio aquático (um de uma amostra de rio e outro de uma amostra de um esgoto urbano com influência de águas residuais hospitalares), produtores de VIM-2. Estes dois isolados geneticamente não relacionados apresentavam o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* inserido num integrão de class 1, In58, o predominante nos isolados hospitalares portugueses, aqui descrito pela primeira vez fora do ambiente hospitalar. Algumas evidências apontam para uma disseminação, com origem hospitalar, deste integrão, até então clinicamente restrito, e que codifica resistência aos antibióticos comumente (no caso do imipenemo exclusivamente) utilizados no tratamento de infecções hospitalares por *P. aeruginosa*. Para além da sua presença dentro de uma das unidades hospitalares estudadas, este integrão

---

foi encontrado a jusante desta unidade, num isolado de um esgoto, não tendo sido detectado a montante. Também não poderá ser ignorada a possibilidade de contaminação com esgotos urbanos contendo águas residuais hospitalares do rio de onde o isolado contendo VIM-2 foi obtido. Para além disso o isolado do rio apresentava identidade clonal com um isolado clínico (do IPO) que também continha o In58. o facto de não se ter observado a presença da VIM-2 em outros nichos ecológicos, como animais, humanos saudáveis e doentes de ambulatório, também reforça a hipótese de que o hospital actuará como fonte de disseminação do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* e integrão em que se encontra inserido.

Foi também, pela primeira, vez identificado uma MBL (VIM-2) em *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, um isolado ambiental obtido a partir de uma amostra de um esgoto hospitalar (número de acesso do GenBank: AY685199). Esta espécie, amplamente distribuída nos solos e habitat aquático, raramente se encontra associada a infecções em humanos, pelo que a presença do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* vem reforçar a ideia de que a disseminação deste determinante genético de resistência ocorrerá a vários níveis, uma vez que pode ser agora encontrado em locais geográficos distintos, em diversas espécies bacterianas e em diferentes ambientes. Integrando parte dos resultados obtidos, foi possível verificar que a disseminação da enzima VIM-2, em Portugal, parece, de facto, ocorrer de distintas formas:

**Disseminação clonal de isolados** A suportar esta ideia está o facto de se terem encontrado estirpes relacionadas (clones) produtoras desta enzima, isoladas em diferentes anos (2001 e 2003) e em locais geográficos distintos (uma do Hospital de S. Teotónio de Viseu e outra do Hospital Geral de Santo António do Porto). Outro exemplo prende-se com o facto de se ter verificado que a estirpe RON-1 isolada em França em 1998, em que Poirel *et al.* (2001a) descrevem o integrão In58, é clonalmente relacionada com um dos isolados portugueses mais antigos (1995) produtores de VIM-2, também associada a um In58, sendo tentador especular que esta estirpe se terá disseminado pelo menos entre os dois países.

**Disseminação de integrões contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*** Este parece ser o caso do integrão In58, amplamente disseminado em isolados de *P. aeruginosa* de vários hospitais portugueses ao longo de vários anos (datando pelo menos de 1995). A disseminação de plasmídeos contendo este integrão também

parece contribuir para a sua elevada prevalência. O integrão In56 poderá ser considerado um exemplo ainda mais interessante desta disseminação, uma vez que foi encontrado tanto em isolados de *P. aeruginosa* como no isolado de *P. pseudoalcaligenes*, em nichos ecológicos distintos. Estes dados estão de acordo com o descrito por autores que defendem a disseminação do integrão como um todo.

**Disseminação da cassette contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*** Vários estudos apontam para o facto de que fenómenos de integração/excisão e rearranjos das cassetes de genes poderão afectar a estrutura dos integrões. Integrões como os que neste trabalho são descritos pela primeira vez poderão ser exemplos dessa mobilidade das cassetes de genes. Além disso, uma vez que as cassetes de genes apresentam a capacidade de se moverem entre integrões, ou mesmo dentro do próprio integrão, poderá esperar-se que as estruturas dos integrões possam reflectir distintas pressões selectivas. Este parece ser o caso do In100, um integrão cuja estrutura parece reflectir a evolução da utilização dos diferentes agentes antibacterianos na terapêutica.

Assim, os dados obtidos apontam para uma disseminação da VIM-2 como resultado final de processos de propagação distintos actuando simultaneamente em diferentes níveis de complexidade, das bactérias às cassetes de genes.

As observações supracitadas enfatizam, assim, a importância do estudo de estirpes ambientais que poderão funcionar como fonte e/ou reservatório de genes de resistência com importância clínica. Adicionalmente, permitem ainda conjecturar sobre o papel, provavelmente exponenciador, dos esgotos hospitalares como meio privilegiado para a disseminação e transferência de genes de resistência em microrganismos circulantes (contaminantes e/ou autóctones), que poderão atingir rios e águas costeiras. Compreende-se, assim, a importância de uma vertente multidisciplinar para correcta compreensão dos mecanismos em acção neste processo de disseminação e surgimento de resistências. Para as bactérias, não existirão verdadeiras barreiras físicas à disseminação. É importante salientar o facto de o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, largamente disseminado em isolados clínicos, ter sido encontrado em bactérias isoladas de águas residuais a jusante do hospital (não a montante), podendo as bactérias resistentes aos carbapenemos ser utilizadas como marcadores de contaminação por resíduos hospitalares, representando um instrumento

---

válido para a protecção da saúde pública e ambiente. Um tratamento, insuficiente e frequentemente incorrecto, dos esgotos e águas residuais, associado à vantagem competitiva e maior capacidade de sobrevivência apresentada por muitas das estirpes com importantes níveis de resistência, tem sido uma questão de crescente relevância em saúde pública, existindo a possibilidade de humanos saudáveis serem colonizados aquando das actividades recreativas em meio aquático ou através do consumo de alimentos, de origem fluvial ou marinha, contaminados.

Finalmente, foi possível, durante o decorrer deste trabalho, descrever pela primeira vez a presença do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* em múltiplas cópias no cromossoma bacteriano. Dados preliminares apontam para uma associação com um transposição do tipo *Tn5051*, o que poderá constituir uma possível explicação para essa localização em multicópias. Ainda que a presença de genes duplicados seja um fenómeno comum em eucariontes, e este facto nem sempre implica um maior grau de expressão, é possível que as multicópias de *bla<sub>VIM-2</sub>* no cromossoma bacteriano impliquem uma maior produção da respectiva metalo- $\beta$ -lactamase. Alternativamente, mesmo que este facto não se verifique, a presença de múltiplas cópias corresponderá sempre a um mais amplo "substrato" evolutivo que potenciará as hipóteses de surgimento de novos genes e, conseqüentemente, de novas enzimas. Estas enzimas, embora partilhando elevada homologia estrutural com VIM-2 (ancestral directo), poderão apresentar preocupantes conseqüências a nível da resistência a antibióticos.

# Apêndice A

## Material e Métodos

### A.1 Amostragem e origem das amostras

#### A.1.1 Nichos ecológicos

No presente trabalho foram utilizadas estirpes de bacilos Gram negativos provenientes de um conjunto alargado de nichos ecológicos, para, de uma forma integrada e simultaneamente diversificada, contribuir para o conhecimento da ecologia das carbapenemases ao longo do contínuo hospital-meio ambiente, numa perspectiva epidemiológica e de saúde pública.

##### A.1.1.1 Amostras de humanos

**A.1.1.1.1 Isolados clínicos hospitalares** Foram utilizados vários isolados hospitalares (predominantemente bacilos Gram negativos não fermentadores da lactose) provenientes de vários hospitais Portugueses e distribuído das seguinte forma:

**Hospital Geral de Santo António (HGSA)** entre 2001 e 2004, foram utilizados 153 isolados de *Acinetobacter* spp provenientes de distintos serviços, nomeadamente cirurgia (n=15), endocrinologia (n=1), ginecologia (n=2), medecinas A, B, C e D (n=22), neurocirurgia (n=8), nefrologia (n=3), neurologia (n=3), observação (n=5), oncologia (n=1), ortopedia (n=3), pediatria

## A.1. AMOSTRAGEM E ORIGEM DAS AMOSTRAS

---

(n=1), traumatismos crânio-encefálicos (n=5), unidade de cuidados intensivos polivalente (n=26), unidade de cuidados pós-operatórios (n=5), serviço de cuidados intensivos (n=53), e de diversos produtos biológicos como os relacionados com o tracto respiratório (n=77), líquido cefalorraquidiano (n=5), líquido peritoneal (n=2), catéteres (n=8), líquido ascítico (n=1), pus (n=10), sangue (n=14), urinas (n=35) e ainda produtos de origem desconhecida (n=1).

**Hospital Geral de Santo António (HGSA)** entre 2001 e 2003, foram utilizados 75 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de distintos serviços, nomeadamente cirurgia (n=7), consulta externa (n=2), medicina física e de reabilitação (n=2), medicina A, B e D (n=7), neurocirurgia (n=2), urologia (n=3), neurologia (n=2), observação (n=3), pediatria (n=1), traumatismos crânio-encefálicos (n=5), unidade de cuidados intensivos polivalente (n=8), unidade de cuidados pós-operatórios (n=2), e serviço de cuidados intensivos (n=8), de origem desconhecida (n=23), e de diversos produtos biológicos como os relacionados com o tracto respiratório (n=41), líquido cefalorraquidiano (n=1), líquido peritoneal (n=1), catéteres (n=2), líquido pleural (n=1), pus (n=9), sangue (n=1), exsudado ocular (n=1), urinas (n=17) e ainda produtos de de origem desconhecida (n=1).

**Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO)** entre 2001 e 2002, foram utilizados 13 isolados de *P. aeruginosa*.

**Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC)** entre 2000 e 2004, foram utilizados 46 isolados de *P. aeruginosa*, 16 de *Acinetobacter* spp, 2 de *Serratia marcescens* e 1 de *Enterobacter aerogenes*, provenientes de distintos serviços e diversos produtos biológicos

**Hospital de S. Teotónio de Viseu (HST)** entre 2000 e 2003, foram utilizados 102 isolados de *P. aeruginosa* e 23 de *Acinetobacter* spp , provenientes de distintos serviços e diversos produtos biológicos

**A.1.1.1.2 Isolados clínicos de ambulatório** Entre 2000 e 2005 foram utilizados 83 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes do Laboratório de

Microbiologia da Faculdade de Farmácia do Porto, obtidos a partir de amostras de diversos produtos biológicos analisados.

**A.1.1.1.3 Isolados de fezes de humanos saudáveis** Foram utilizadas amostras de fezes ( $n=24$ ) de indivíduos saudáveis da comunidade, recolhidas em 2001, na zona Norte e Centro de Portugal, para serem utilizadas noutros trabalhos em curso no laboratório. As colheitas foram executadas pelos próprios indivíduos utilizando zaragatoas e tubos de vidro estéreis.

### **A.1.1.2 Amostras de animais**

**A.1.1.2.1 Isolados de aves** Foram utilizadas 30 amostras de frango, colhidas entre 2002 e 2003, em três talhos da cidade do Porto e representando diversos fornecedores/distribuidores nacionais. As amostras encontravam-se refrigeradas no momento da colheita, sendo a vasta maioria colhida pouco tempo após a sua chegada ao local de comercialização. As amostras foram colhidas assepticamente utilizando material esterilizado (tesouras e pinças), sendo colocadas em recipientes individuais de plástico ou vidro esterilizado, e transportadas imediatamente para o laboratório. A maioria das amostras de frango era constituída por porções de pele e gordura e por vezes pedaços de carne.

**A.1.1.2.2 Isolados de suínos** Amostras de fezes de 4 suínos, provenientes de um local de produção situado no distrito de Braga, recolhidas para utilização em trabalhos em curso no laboratório, foram também utilizadas.

### **A.1.1.3 Amostras ambientais**

**A.1.1.3.1 Isolados de águas residuais hospitalares** Entre Janeiro de 2001 e Maio de 2002 foram colhidas águas residuais no sistema de drenagem de 5 hospitais da cidade do Porto: Hospital de S. João, Hospital Geral de Santo António, Hospital Joaquim Urbano, Ordem de S. Francisco e Ordem do Carmo.

Vinte e nove amostras foram recolhidas no sistema de drenagem das águas residuais, 14 a montante e 15 a jusante do ponto de descarga das águas hospitalares provenientes desses 5 hospitais. As colheitas, nos dois pontos seleccionados,

## A.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES

---

foram realizadas no mesmo dia para cada hospital, por uma equipa dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento (SMAS) do Porto. As amostras foram mantidas a 4°C até posterior processamento.

**A.1.1.3.2 Isolados de águas de rios** Em 2003, amostras de águas de rios foram obtidas na área do grande Porto, nas margens dos rios Sousa (n=1), Coura (n=2) e estuário do Douro (n=3). As colheitas foram realizadas por uma equipa dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento (SMAS) do Porto. As amostras foram mantidas a 4°C até posterior processamento.

## A.2 Isolamento e identificação das estirpes

De um modo geral, a identificação das colónias obtidas foi efectuada por provas bioquímicas clássicas e utilizando o sistema de identificação API 32GN (bioMérieux). As estirpes foram guardadas em gelose inclinada a 4°C e alíquotas foram conservadas em TSB (Trypticase Soy Broth) (Oxoid) com 15% de glicerol, a -70°C.

### A.2.1 Isolados humanos

#### A.2.1.1 Isolados hospitalares

As bactérias foram cedidas pelos diferentes hospitais, previamente isoladas e identificadas, tendo sido congeladas a -70°C em TSB (Trypticase Soy Broth) com 15% de glicerol.

#### A.2.1.2 Isolados de ambulatório

As bactérias foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da FFUP, previamente isoladas e identificadas, tendo sido congeladas a -70°C em TSB (Trypticase Soy Broth) com 15% de glicerol.

### A.2.1.3 Isolados de fezes de humanos saudáveis

Cerca de 10 mL de um caldo de BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid) foram adicionados ao recipiente que continha a zaragatoa de fezes, para posterior homogeneização. Esta suspensão de fezes foi sujeita a um processo de enriquecimento, num banho com agitação a 37°C, durante um período de 48h. A partir desta suspensão, 100 µL foram espalhados à superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura MacConkey agar (Oxoid) e imipenemo (1µg/mL). A incubação foi realizada a 37°C, durante 24h. As colónias obtidas foram congeladas a -70°C em TSB (Trypticase Soy Broth), com 15% de glicerol, para posterior estudo e caracterização.

### A.2.2 Isolados de animais

#### A.2.2.1 Isolados de aves

Uma vez que as amostras de aves foram recolhidas para utilização em vários trabalhos a decorrer no laboratório de Microbiologia da FFUP, nomeadamente o do estudo de incidência de *Salmonella* em produtos avícolas, o método de isolamento e identificação seleccionado foi o descrito na Norma ISO 6579 (1993). Assim, e de acordo com esta metodologia, 25 g de cada amostra foram adicionadas asépticamente a 225 mL do meio de pré-enriquecimento Buffered Peptone Water (Oxoid) e incubadas 18h, a 37°C. Desta cultura de pré-enriquecimento retiraram-se 100 µL que foram espalhados à superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura MacConkey agar (Oxoid) e/ou Pyocyanosel agar (Oxoid) suplementados com imipenemo (1µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24h. As colónias obtidas foram congeladas a -70°C em TSB (Trypticase Soy Broth) com 15% de glicerol para posterior estudo e caracterização.

#### A.2.2.2 Isolados de suínos

Zaragatoas contendo fezes de suínos foram suspensas em 2 mL de soro fisiológico estéril. Destas suspensões foram retirados 100 µL que foram espalhados à superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura MacConkey agar suplementado com imipenemo (2µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24h.

### **A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS**

---

As colónias obtidas foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em TSB (Trypticase Soy Broth) com 15% de glicerol para posterior estudo e caracterização.

#### **A.2.3 Isolados ambientais**

##### **A.2.3.1 Isolados de Águas Residuais Hospitalares**

Após homogeneização das amostras, 100  $\mu\text{L}$  de água foram espalhados à superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura MacConkey agar suplementado com imipenemo ( $2\mu\text{g/mL}$ ). As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24h. As colónias obtidas foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em TSB (Trypticase Soy Broth) com 15% de glicerol para posterior estudo e caracterização.

##### **A.2.3.2 Isolados de águas de rios**

O método de isolamento utilizado para as bactérias provenientes destas amostras foi o de filtração por membrana. Cerca de 100mL de cada amostra de água, depois de homogeneizados, foram filtrados através de uma membrana de nitrocelulose (Millipore) de  $0,45\mu\text{m}$  de poro, estéril, com auxílio de sistemas de filtração Millipore. As membranas com o filtrado foram colocadas em placas de Petri contendo os meios de cultura MacConkey agar e/ou Pyocyanosel agar suplementados com imipenemo ( $2\mu\text{g/mL}$ ) e colocadas a incubar, durante 24h, a 30 e  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **A.2.4 Estirpes de colecção e estirpes controlo**

Em várias das técnicas utilizadas no decurso do trabalho foram usadas estirpes de colecção e estirpes controlo que se encontram discriminadas na Tabela A.1.

### **A.3 Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos**

#### **A.3.1 Método de difusão em agar com discos**

Foram preparadas suspensões bacterianas para cada estirpe em estudo, de turvação comparável a 0,5 MacFarland. Mergulhou-se uma zaragatoa na suspensão e

Tabela A.1: Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho

| Estirpe                                    | Características                           | Referência                    |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922                  | Estirpe de referência                     | ATCC                          |
| <i>E. coli</i> K12                         | Estirpe de referência                     | FFUP                          |
| <i>E. coli</i> BM21 Rif <sup>R</sup>       | Resistente à rifampicina                  | Este trabalho                 |
| <i>E. coli</i> K802N Rif <sup>R</sup>      | Resistente à rifampicina                  | Este trabalho                 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853            | Estirpe de referência                     | ATCC                          |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC Rif <sup>R</sup> | Resistente à rifampicina                  | Este trabalho                 |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO                   | Estirpe de referência                     | ATCC                          |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO Rif <sup>R</sup>  | Resistente à rifampicina                  | Este trabalho                 |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 19606             | Estirpe de referência                     | ATCC                          |
| <i>A. baumannii</i> CLA-1                  | Produtora de <i>bla</i> <sub>OXA-40</sub> | Héritier <i>et al.</i> (2003) |
| <i>A. baumannii</i> 988FFP                 | Produtora de <i>bla</i> <sub>OXA-40</sub> | Da Silva <i>et al.</i> (2004) |
| <i>A. baumannii</i> 65FFC                  | Produtora de <i>bla</i> <sub>IMP-5</sub>  | Da Silva <i>et al.</i> (2002) |
| <i>P. aeruginosa</i> 3763                  | Produtora de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>  | Cardoso <i>et al.</i> (2002)  |
| <i>P. aeruginosa</i> 3483                  | Produtora de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>  | Cardoso <i>et al.</i> (2002)  |
| <i>P. aeruginosa</i> Ps32                  | Produtora de <i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>  | L. Poirel                     |
| <i>P. aeruginosa</i> COL-1                 | Integração In56                           | Poirel <i>et al.</i> (2000b)  |
| <i>P. aeruginosa</i> RON-1                 | Integração In58                           | Poirel <i>et al.</i> (2001a)  |
| Epicurian coli XL10-Gold Kan               | Células ultracompetentes                  | Stratagene                    |
| Plasmídeos                                 | Características                           | Referência                    |
| pPCR-Script Cam SK (+)                     | vector de clonagem                        | Stratagene                    |
| pUC18                                      | plasmídeo controle                        | Stratagene                    |

semearam-se placas de Mueller-Hinton Agar II (bioMérieux). Posteriormente, colocaram-se os discos contendo os antibióticos a testar sobre a superfície do meio inoculado e incubaram-se as placas a 37°C, durante cerca de 18 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com uma craveira e, recorrendo às tabelas do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (anteriormente designado NCCLS) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002) foi possível classificar a estirpe, de acordo com a

### A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

---

inibição observada, nas categorias sensível, intermédia ou resistente.

Foram utilizados os seguintes discos de antibióticos: ceftazidima (30 $\mu$ g), aztreonam (30 $\mu$ g), imipenem (10 $\mu$ g), meropenem (10 $\mu$ g), cefepime (30 $\mu$ g), piperacilina (100 $\mu$ g), piperacilina + tazobactam (100/10 $\mu$ g), gentamicina (10 $\mu$ g), canamicina (30 $\mu$ g), netilmicina (30 $\mu$ g), ampicacina (30 $\mu$ g), tobramicina (10 $\mu$ g) e ciprofloxacina (5 $\mu$ g) (Oxoid).

#### A.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

##### A.3.2.1 Método de diluição em agar

O perfil de susceptibilidade das estirpes de *A. baumannii* à Polimixina E (colistina) foi determinado pelo método de diluição em agar, utilizando o meio de Mueller-Hinton Agar II, com incubação das placas a 37°C durante 24h, de acordo com os procedimentos publicados pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute*, (CLSI) (anteriormente designado NCCLS) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). As concentrações de colistina utilizadas variaram entre 0,5  $\mu$ g/mL e 64  $\mu$ g/mL. A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano foi registada como sendo a concentração mínima inibitória (CMI). Quanto à classificação das estirpes ensaiadas nas categorias sensível, intermédia ou resistente, e uma vez que as normas não contemplam este antibiótico, desde 1981, optou-se por considerar um breakpoint de  $\geq 4$   $\mu$ g/mL.

As estirpes *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controlos.

##### A.3.2.2 Método de difusão em agar com tiras ("E-test")

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias de alguns antibióticos foi utilizado o método de difusão em agar com tiras, designado E-test (Epsilon-test) (AB- Biodisk, Solna, Suécia).

O E-test (Ab Biodisk) utiliza tiras comerciais de plástico de 5x50 mm, impregnadas com um antibiótico em gradiente de concentração pré-formado e estável, que varia entre 0,016 e 256 mg/L ou 0,002 e 32 mg/L, consoante o antibiótico. O inóculo bacteriano foi preparado a partir de 3-4 colónias por suspensão em

soro fisiológico estéril, de modo que a turvação fosse equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Com uma zaragatoa previamente mergulhada na suspensão bacteriana, foram inoculadas placas de agar Mueller-Hinton, depositando-se posteriormente a tira com o antibiótico sobre a superfície do agar. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas, considerando-se como valor da CIM (mg/L) o ponto de intersecção entre o crescimento bacteriano sobre a superfície do agar e a tira do E-test. Foram determinadas, por este método, as CMI's para os seguintes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: imipenemo, meropenemo, cefepime, ceftazidima, aztreonamo, piperacilina e piperacilina/tazobactam.

A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controlo.

### **A.3.3 Estudo dos mecanismos, estrutura e suporte genético da resistência aos antibióticos**

### **A.3.4 Caracterização das $\beta$ -lactamases**

#### **A.3.4.1 Preparação dos extractos enzimáticos**

Os extractos brutos das estirpes foram obtidos com a mesma metodologia utilizada por Peixe (1996). As estirpes foram cultivadas, *over-night*, em TSB a 37°C. Posteriormente, foi transferido cerca de 1 ml destas culturas para 50 ml de TSB e incubados a 37°C com agitação, durante cerca de 3h. As culturas assim obtidas foram então centrifugadas a 4000 G, durante 15 min, a 4°C. Os sedimentos foram lavados com soro fisiológico, novamente centrifugados, e ressuspensos em 1 ml de água destilada. As suspensões obtidas foram sonicadas em banho de gelo, durante 2 min., com intervalos de 30s com um sonicador Vibra-Cell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc, USA). Os sonicados foram centrifugados em tubos Eppendorf a 13000 rpm, durante 15 min., a 4°C e os sobrenadantes foram congelados a -20°C até posterior utilização.

#### **A.3.4.2 Detecção de actividade $\beta$ -lactamásica nos extractos enzimáticos (teste do nitrocefina)**

A presença de  $\beta$ -lactamases nos extractos enzimáticos brutos foi detectada pela adição de cerca de 5  $\mu$ L de uma solução de nitrocefina (100  $\mu$ M) (Glaxo Far-

### A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

---

macêutica) a 5  $\mu$ L de extracto bruto. O nitrocefina é uma cefalosporina cromogénica que muda de cor por hidrólise do seu anel  $\beta$ -lactâmico. A alteração da cor amarela da solução de nitrocefina para laranja ou vermelho (num tempo inferior a 1 min) revelou a presença de  $\beta$ -lactamases.

#### A.3.4.3 Determinação do ponto isoelectrico das $\beta$ -lactamases

O ponto isoelectrico das  $\beta$ -lactamases em estudo foi determinado por focagem isoelectrica que se efectuou no sistema Phast System (Pharmacia), de acordo com as recomendações estabelecidas pelo fabricante. Foram utilizados geles comerciais de poliacrilamida com anfólitos de gradiente de pH de 3 a 9 e de 5 a 8 (PhastGel 3-9, PhastGel 5-8, Pharmacia). Em paralelo, utilizaram-se vários padrões (extractos de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de pl conhecido), nomeadamente, TEM 1 (5,4), TEM 4 (5,9), TEM 6 (5,87), CAZ 2 (6,0), CAZ 6 (6,5), OXA 1 (7,4), SHV 1 (7,6), SHV 5 (8,2) e (6,6) (Bush *et al.*, 1995).

A revelação das bandas correspondentes às  $\beta$ -lactamases presentes no gel foi efectuada por adição de cerca de 100  $\mu$ L de uma solução de nitrocefina (100  $\mu$ M).

#### A.3.5 Detecção de carbapenemases

##### A.3.5.1 Preparação de extractos brutos

Os extractos enzimáticos brutos dos isolados em estudo foram obtidos como descrito anteriormente.

##### A.3.5.2 Bioensaio

Este método foi utilizado para pesquisar a presença de carbapenemases nos extractos brutos obtidos de isolados que apresentavam resistência ao imipenemo. Discos comerciais de imipenemo (10  $\mu$ g) foram impregnados com cerca de 20  $\mu$ L de cada extracto e colocados a 37°C durante cerca de 30 min. Paralelamente a cerca de 20  $\mu$ L de cada extracto adicionaram-se cerca de 20  $\mu$ L de uma solução de EDTA (2 mM) que também incubaram a 37°C cerca de 30 min antes de serem transferidos para um disco de imipenemo. Estes discos, bem como um disco de imipenemo sem qualquer extracto, foram colocados numa placa contendo o meio

de cultura Mueller-Hinton II, previamente inoculada com uma estirpe sensível ao imipenemo, *Escherichia coli* ATCC 25922. Após incubação a 37°C, durante 18h, os halos de inibição do crescimento da estirpe de *E. coli* foram medidos por forma a verificar se o extracto enzimático da estirpe em estudo teria inativado ou não o imipenemo e se essa inactivação era reposta com a presença de EDTA. Uma redução do tamanho do halo correspondente ao disco de imipenemo impregnado com o extracto em relação ao tamanho do halo obtido com o disco de imipenemo sem extracto foi considerado indicativo da presença de uma enzima com actividade sobre o imipenemo (presença de uma carbapenemase). Por outro lado, um aumento do tamanho do halo relativo ao disco de imipenemo impregnado com o extracto e EDTA, relativamente ao tamanho do disco de imipenemo contendo apenas o extracto foi considerado como indicativo da presença de uma metallo- $\beta$ -lactamase.

Em alguns casos, um outro método para a detecção rápida da presença de uma metallo- $\beta$ -lactamase foi também utilizado. Preparou-se uma suspensão bacteriana de cada estirpe em estudo, de turvação comparável a 0,5 MacFarland. Mergulhou-se uma zaragatoa na suspensão e semearam-se placas de Mueller-Hinton Agar II (bioMerieux). Posteriormente, colocaram-se discos de imipenemo com e sem EDTA (750  $\mu$ g) sobre a superfície do meio inoculado e incubaram-se as placas a 37°C, durante cerca de 18 horas. Um aumento ( $> 2$ mm) do halo de inibição correspondente ao disco de imipenemo com EDTA foi interpretado como sugestivo da produção de uma MBL.

### A.3.6 Transferência da resistência

#### A.3.6.1 Transferência da resistência ao imipenemo por conjugação

Para as estirpes que apresentaram resistência ao imipenemo efectuaram-se ensaios de transferência genética, nomeadamente conjugação. Dependendo da situação, diferentes estirpes foram utilizadas como estirpe receptora: *E. coli* K802N (desprovida de plasmídeos), resistente à rifampicina, *E. coli* BM21 mutada para resistência à rifampicina, *P. aeruginosa* ATCC e *P. aeruginosa* PAO, também resistentes à rifampicina.

As estirpes dadoras e a receptora foram cultivadas, *over-night*, em TSB a

### A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

---

37°C. Posteriormente, transferiu-se cerca de 1mL destas culturas para 50 ml de TSB e incubou-se a 37°C com agitação, até se atingir a fase exponencial ( $5 \times 10^8$  bact/ml). Posteriormente colocaram-se 100  $\mu$ L da cultura da estirpe dadora sobre 100  $\mu$ L da cultura da estirpe receptora em placas de Mueller-Hinton, incubando-se a 37°C/18h. Os transconjugantes foram seleccionados em placas de Mueller-Hinton contendo rifampicina (100 mg/L) e amoxicilina (30 mg/L) ou imipenemo (2 mg/L), por sementeira directa desta cultura e de diluições da mesma em soro fisiológico.

#### A.3.6.2 Extracção de DNA plasmídico

Para a extracção de DNA plasmídico foram utilizadas diversas abordagens, nomeadamente métodos convencionais como o método de Kado e Liu (com e sem modificações) e vários "kits" comerciais.

**A.3.6.2.1 Técnica de Kado e Liu** Um dos protocolos utilizados no presente trabalho para a detecção de DNA plasmídico foi o de Kado & Liu (1981). O método utiliza as características moleculares do DNA extraído das células, utilizando dodecilsulfato de sódio, sob condições que desnaturam o DNA cromossómico. As proteínas são removidas por extracção com fenol-clorofórmio. Nestas condições o DNA cromossómico é reduzido ou eliminado. O extracto clarificado é utilizado directamente para a análise electroforética.

De uma cultura em fase exponencial das estirpes em estudo, procedeu-se à centrifugação de cerca de 600  $\mu$ L, durante 5 minutos, a 6000 rpm, em tubos de Eppendorf. De modo a obter uma quantidade suficiente de *pellet*, este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, o sedimento foi lavado com soro fisiológico estéril e centrifugado a 6000 rpm, durante 5 min. O sobrenadante obtido foi rejeitado e as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8). Adicionaram-se 100  $\mu$ L de SDS/Tris (SDS 4 % + Tris 100 mM) e 100  $\mu$ L de NaOH 0,2 N e inverteu-se suavemente cada tubo. Adicionaram-se 600  $\mu$ L de fenol - clorofórmio (v/v) seguindo-se uma agitação suave e centrifugação a 14000 rpm, durante 5 min. A fase aquosa obtida foi recuperada para um outro tubo, ao qual se adicionou 2 volumes de fenol - clorofórmio. Agitou-se suavemente e voltou-se a centrifugar a 14000 rpm,

durante 5 min. À fase aquosa obtida adicionou-se 1/10 do volume de NaOH 3 M (pH 4,8) e 2,5 volumes de etanol. Posteriormente, e por forma a favorecer a precipitação do DNA, a mistura foi colocada a -20°C, durante 20 min. Depois, procedeu-se à sua centrifugação a 14000 rpm, durante 5 min, rejeitando-se o sobrenadante. Após evaporação do etanol, o *pellet* foi ressuspenso em 10 µl de água e 10 µl de corante. A amostra assim obtida foi analisada por electroforese em gel de agarose.

**A.3.6.2.2 Isolamento de DNA plasmídico utilizando "Kits" comerciais** A maioria dos "kits" comerciais extracção de DNA plasmídico baseia-se no método de desnaturação por lise alcalina. Geralmente, após a lise celular, a solução é passada por uma coluna que contém uma resina que adsorve o DNA plasmídico e que, depois de lavado, se elui com tampão TE (Tris-EDTA) ou água bi-destilada estéril. No presente trabalho foram utilizados os "kits" (*Qiagen Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) e *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo os protocolos e instruções de cada fabricante.

### A.3.6.3 Electroforese em gel de agarose

A electroforese do DNA plasmídico foi efectuada em geles de agarose (Agarose NA, Amersham Pharmacia Biotech) com uma concentração de 0,8%, em tampão TBE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido bórico, pH 8).

A cerca de 10 µl de DNA plasmídico extraído, utilizando as técnicas anteriormente descritas, adicionou-se, numa proporção de 5:1, o tampão de carga (5x, glicerol, 25%; azul de bromofenol, 0,25%), depositando-se, com uma micropipeta, nos poços do gel de agarose. A migração ocorreu a 80 V durante cerca de 2h em tampão de corrida TBE 0,5x. No fim da corrida electroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante cerca de 30 minutos, e observado com auxílio de um transiluminador de luz UV (W-Transiluminator, UVP, Inc.). Foi possível ainda fazer a digitalização do gel utilizando um sistema de aquisição e tratamento de imagem da KODAK (Kodak Digital Science 1D).

### A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

---

#### A.3.7 Condições gerais das reacções de amplificação de DNA por PCR

##### A.3.7.1 Obtenção de DNA total

O DNA cromossômico das estirpes em estudo foi obtido utilizando o método de Seifert *et al.* (1997). De cada uma das estirpes cultivadas em meio sólido, durante 24 h, retirou-se uma porção com uma ansa e suspendeu-se em 20  $\mu$ l de solução NaOH-SDS (0,05M NaOH; 0,25% SDS). Posteriormente, colocou-se em banho-maria a 95°C durante 15 min. e dilui-se até 200  $\mu$ L de volume final com TE, agitando cuidadosamente. Centrifugou-se a 13000 rpm e os sobrenadantes, contendo o DNA, foram utilizados nas reacções de PCR.

##### A.3.7.2 Condições de amplificação

Os *primers*, reagentes, temperaturas e tempos necessários à amplificação dos diferentes genes, pesquisados neste estudo, encontram-se discriminadas na Tabela A.3 e A.4. Os termocicladores utilizados na realização das reacções de amplificação foram um Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400), ou então um BioRad iCycler.

Os oligonucleótidos específicos para cada reacção foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies, com base em sequências publicadas.

##### A.3.7.3 Caracterização dos produtos de amplificação por electroforese

De um modo geral, os produtos das reacções de PCR foram analisadas electroforéticamente em geles de agarose (Pharmacia) a 1% em tampão TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8), a 90 V, durante cerca de 60 min. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o 100bp DNA Ladder (Promega) e o 250bp DNA Ladder (Promega). Foi utilizado o corante "Blue/Orange Loading Dye, 6x (G188A)" (Promega) para colocar as amostras de DNA, bem como o marcador, nos poços do gel de electroforese e seguir a sua migração durante a corrida electroforética. Os geles foram corados com brometo de etídeo (0,5 g/mL) e o tamanho dos fragmentos obtidos calculado com o programa de software

Kodak Digital Science 1D por comparação da mobilidade observada com o marcador de peso molecular utilizado.

#### A.3.7.4 Pesquisa de genes de resistência ao imipenemo

No presente trabalho foram pesquisados os principais genes que codificam para as metallo- $\beta$ -lactamases mais frequentes em isolados resistentes ao imipenemo: *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>SPM-1</sub>*. Foram ainda pesquisados genes *bla<sub>OXA</sub>* que codificam para oxacilinasas que também conferem resistência aos carbapenemos.

A pesquisa dos genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>* foi realizada em Multiplex PCR com utilização simultânea de primers específicos para IMP (OLG1 e OLG2) e VIM (VIP1 e VIP2) (Tabela A.3 e A.4) na mesma reacção de amplificação. As condições de amplificação encontram-se descritas na Tabela A.2.

A pesquisa de genes *bla<sub>OXA</sub>* foi feita por PCR, em isolados de *A. baumannii*, que apresentavam resistência ao imipenemo, utilizando os primers OXAFP2 e OXARP1 (Tabela A.3 e A.4), e as condições descritas na Tabela A.2.

#### A.3.7.5 Pesquisa de integrões de classe 1

Dado que a maioria dos genes codificadores de metallo- $\beta$ -lactamases estão associados a integrões de classe 1, as sequências conservadas 5'CS e 3'CS foram também pesquisadas por PCR utilizando primers específicos para esse local (Int 5'CS e Int 3'CS) (Tabela A.3 e A.4)

### A.3.8 Hibridação de sondas de DNA

#### A.3.8.1 Preparação das sondas

As sondas utilizadas nas reacções de hibridação por dot blot foram sondas para *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>SPM-1</sub>*. Obtiveram-se por reacções de PCR utilizando primers específicos para cada uma delas (Tabela A.3 e A.4). Os produtos assim obtidos foram purificados com o kit *GFX PCR purification kit* (Amersham Biosciences) e a sua concentração foi avaliada por medição espectrofotométrica.

### A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

---

#### A.3.8.2 Marcação das sondas

A marcação das sondas foi efectuada por um método de marcação directa com a enzima fosfatase alcalina, utilizando-se o "Kit" Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

#### A.3.8.3 Hibridação por *Dot blot*

O DNA total das amostras foi obtido de acordo com o descrito anteriormente. Posteriormente, foi desnaturado, colocando-se as amostras em água fervente durante 5 min. e arrefecendo logo de seguida em gelo. Centrifugou-se rapidamente e utilizou-se o sobrenadante como amostra a aplicar. Aplicaram-se 3 µL de DNA da cada amostra numa membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech), deixando um intervalo de cerca de 1,5 cm entre cada amostra. A fixação do DNA à membrana foi feita com uma luz ultravioleta durante 2 min. Seguiram-se as reacções de hibridação com as sondas marcadas, que decorreram "overnight" a 55°C com agitação constante, e posteriormente as várias lavagens de restringência. Finalmente, as membranas foram colocadas em contacto com o reagente de detecção (RPN 3682, Amersham Biosciences) e expostas com um filme (Hyperfilm-ECL, Amersham Life Science). Após exposição (aproximadamente 1 hora), removeu-se o filme e revelou-se (Kodak GBX developer and fixer).

#### A.3.9 Pesquisa da localização genética dos genes *bla<sub>VIM-2</sub>* e *bla<sub>OXA</sub>* (Técnica da I-CeuI)

##### A.3.9.1 Hibridação de fragmentos digeridos com a enzima I-CeuI

Nos casos em que os ensaios de conjugação falharam, ou em que não foi possível visualizar plasmídeos por nenhuma das técnicas de extracção utilizada, a localização genética dos determinantes de resistência em estudo foi determinada recorrendo a uma técnica que se passou a designar técnica I-CeuI. Assim, *plugs* (moldes em agarose contendo uma suspensão bacteriana) da bactéria em estudo foram preparados e digeridos, *overnight* com a enzima de restrição I-CeuI (New England Biolabs) que é uma endonuclease específica para genes rRNA (Liu

*et al.*, 1993) que reconhece locais específicos da sequência do gene 23S rRNA nos operões *rrn* do genoma bacteriano. Após a digestão enzimática, a separação dos fragmentos resultantes foi feita por electroforese em campo pulsado (PFGE) num CHEF DR-III (bioRad). Os fragmentos assim obtidos foram posteriormente transferidos para uma membrana de nylon (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech) utilizando a técnica de *Southern bot.* Após esta transferência, por capilaridade, que decorreu *overnight*, o DNA foi fixado à membrana com uma luz ultravioleta durante 2 min.

Sondas de diferentes tamanhos, correspondendo aos diferentes genes em estudo, foram obtidas por PCR usando *primers* específicos e condições de amplificação anteriormente descritas (ver Tabela A.2). Adicionalmente uma sonda de 1504 bp para os genes 16S e 23S rRNA (Héritier *et al.*, 2003) foi produzida com o objectivo de confirmar se as bandas obtidas com I-CeuI eram realmente cromossómicas. A marcação e revelação dos genes na membrana de nylon foram executadas com o Kit *ECLTM Random Prime Labelling and Detection Systems* (Amersham Life Science) ou com o Kit *Gene ImagesTM AlkPhos DirectTM Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A estirpe *E. coli* K12 foi utilizada como controlo negativo.

### A.3.9.2 Hibridação de fragmentos digeridos com a enzima BamHI

Adicionalmente, a sonda para o gene *bla<sub>IMI</sub>* foi também utilizada na hibridização de uma membrana de nylon contendo os fragmentos RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) obtidos após digestão do DNA genómico com a enzima de restrição BamHI. Os *plugs* de agarose de cada bactéria em estudo, obtidos como indicado posteriormente, foram digeridos com BamHI (50 U), *overnight*, posteriormente incorporados em gel de agarose e submetidos a uma electroforese em tampão TBE 0,5X, a 40 V, durante 48 h. A transferência dos fragmentos obtidos para uma membrana de nylon e posterior hibridação com a sonda específica foi efectuada como descrito no ponto anterior.

A.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Tabela A.2: Descrição dos primers, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reacções de PCR

| Objectivo                                                                        | Primers                             | Reagentes                                                                                         | Condições de amplificação                                                               | Tamanho do produto (bp)                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Pesquisa simultânea de genes <i>bla<sub>IMP</sub></i> e <i>bla<sub>TEM</sub></i> | VIP1, VIP2, OLGI e OLG2             | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-2min (1 ciclo), 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-3min (35 ciclos), 72°C-7min (1 ciclo)   | <i>bla<sub>IMP</sub></i> ( 587 bp);<br><i>bla<sub>TEM</sub></i> (815 bp) |
| Pesquisa do gene <i>bla<sub>SPM-1</sub></i>                                      | SPM-1 F e SPM-1R                    | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-10min (1 ciclo), 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min (38 ciclos), 72°C-10min (1 ciclo) | 800 bp                                                                   |
| Pesquisa do gene <i>bla<sub>OXA</sub></i>                                        | OXA-1 e OXA-2                       | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-3min (1 ciclo), 94°C-1min, 50°C-1min, 72°C-2min (30 ciclos), 72°C-8min (1 ciclo)   | 980 bp                                                                   |
| Pesquisa de integreções de classe I                                              | Int 5'CS e Int 3'CS                 | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-5min (1 ciclo), 94°C-1min, 53°C-1min, 72°C-6min (35 ciclos), 72°C-16min (1 ciclo)  | De acordo com a estrutura do integrão                                    |
| Sonda 16S rRNA                                                                   | SeqA e SeqB                         | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-10min (1 ciclo), 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min (35 ciclos), 72°C-10min (1 ciclo) | 1500 bp                                                                  |
| Pesquisa do gene da integrase I                                                  | INT-F e INT-R                       | Tampão 1X, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 pmol de cada primer, 0,2mM de dNTPs, 0,5U Taq Polimerase | 94°C-5min (1 ciclo), 94°C-30s, 62°C-30s, 72°C-1min (30 ciclos), 72°C-8min (1 ciclo)     | 898 bp                                                                   |
| Amplificação das regiões flancadoras do integrão                                 | Int400, Int300, R1, R2, R3, R4 e S1 | TripletMaster Polymerase Mix, 0,2 µM de dNTPs, 20 pmol de cada primer e 2 µL de DNA               | 94°C-3min (1 ciclo), 94°C-30s, 62°C-30s, 72°C-3min (35 ciclos), 72°C-10min (1 ciclo)    | Variável                                                                 |
| Caracterização dos integres                                                      | combinação de diferentes primers    | PCR SuperMix (Invitrogen), 300µM de cada primer e 2µL de DNA                                      | 94°C-5min (1 ciclo), 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-3min (30 ciclos), 72°C-5min (1 ciclo)     | Variável                                                                 |

## **A.4 Estudo da relação clonal entre os isolados resistentes ao imipenemo**

### **A.4.1 Genotipagem por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)**

O estudo da relação clonal entre os isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes ao imipenemo foi realizado utilizando o método de electroforese em gel em campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, considerado, de entre os vários métodos moleculares de tipagem bacteriana, o método padrão (Olive & Bean, 1999). O método consiste basicamente em incorporar as bactérias em agarose e sujeitá-las *in situ* à lise por enzimas e detergentes e à digestão do DNA por uma enzima de restrição de corte infrequente. Os blocos são colocados num gel de agarose e a electroforese é realizada num aparelho em que a polaridade da corrente é alterada em intervalos pré-determinados. O campo pulsado permite, assim, a separação de DNA de grandes dimensões. A visualização dos perfis electroforéticos é feita após coloração com brometo de etídio.

#### **A.4.1.1 Preparação do DNA para PFGE**

A preparação do DNA total bacteriano para análise em PFGE foi realizada com base no descrito por Gautom (1997) e no método de referência utilizado pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention CDCP, 2002).

#### **A.4.1.2 Preparação dos *plugs* a partir de culturas em meio sólido**

A partir de culturas puras em gelose nutritiva (Blood Agar, Oxoid) com 14-18h de incubação, prepararam-se suspensões bacterianas em 2 mL do tampão de suspensão (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8,0). Transferiram-se 400  $\mu$ L de cada suspensão para um tubo de microcentrifuga ao qual se adicionaram 20  $\mu$ L de proteinase K (a 20 mg/mL) e 400  $\mu$ L de 1% agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience Rockland, Inc, USA) : 1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Sigma) em tampão TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8,0), mantida a 55°C em banho de água. Esta mistura foi imediatamente colocada em moldes apropriados, deixando-se solidificar à temperatura ambiente durante 10-15 min.

#### A.4. ESTUDO DA RELAÇÃO CLONAL ENTRE OS ISOLADOS RESISTENTES AO IMIPENEMO

---

##### A.4.1.3 Lise celular nos *plugs* de agarose

Depois de solidificados, os blocos de agarose foram transferidos para tubos de 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% Sarcosyl) e 25  $\mu$ L de proteinase K (a 20 mg/mL). Incubou-se a 54°C, em banho com agitação constante e vigorosa (175-200 rpm), durante cerca de 2h. Posteriormente, a solução de lise foi cuidadosamente retirada e substituída por água ultrapura estéril pré-aquecida a 50°C e colocando-se os tubos a incubar a 50°C com agitação vigorosa, durante períodos de 10-15 min, dando-se, desta forma, início às lavagens dos moldes de agarose. Este procedimento foi repetido (5x) com a utilização de tampão TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8,0), pré-aquecido a 50°C. A partir deste ponto os blocos de agarose com o DNA incorporado podem ser guardados durante vários meses a 4°C em tampão TE, até serem utilizados ou então passarem à fase seguinte, a restrição com enzimas.

##### A.4.1.4 Digestão com enzimas de restrição do DNA contido nos *plugs* de agarose

Uma pequena fatia de cada molde de agarose foi cortada com auxílio de uma lamela e colocada num tubo de microcentrífuga ao qual se adicionou a solução contendo a respectiva enzima de restrição: XbaI (50 U), SpeI (20 U) ou ApaI (20 U) (New England Biolabs). A digestão decorreu *overnight* à temperatura óptima de actuação de cada enzima em utilização.

##### A.4.1.5 Separação dos fragmentos de DNA por PFGE

A electroforese foi realizada em gel de agarose (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bioscience Rockland, Inc, USA) a 1% e a 1,8%, para *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, respectivamente, em tampão TBE 0,5X, num aparelho CHEF DR-III (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). No caso de *P. aeruginosa* foi adicionada tio-ureia (50  $\mu$ M) ao tampão, como recomendado por Romling & Tummeler (2000).

Os blocos de agarose (*plugs*) foram aplicados directamente no pente e posteriormente adicionada a agarose liquefeita a 58°C. Depois de solidificado, o gel

contendo os plugs foi colocado na tina e a electroforese realizada com diferentes condições dependendo das estirpes em estudo e da enzima utilizada na restrição:

**Estudo da relação clonal de *P. aeruginosa*** • pulsos de 1-20s, 14°C, 200 V, durante 20h, no caso da utilização da enzima XbaI.

- pulsos de 5-15s durante 12h e de 15-45s durante 12h adicionais, 14°C, 200 V, no caso da utilização da enzima SpeI.

**Estudo da relação clonal de *A. baumannii*** • pulsos de 5-13s, 14°C, 200 V, durante 25h.

### A.4.1.6 Visualização e interpretação do perfil electroforético obtido por PFGE

Após a electroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) durante 30 min e, quando necessário, descorado em água durante 10-15 min com suave agitação. A imagem do gel foi digitalizada com o programa de software Kodak Digital Science 1D e as relações clonais, baseadas nos fragmentos obtidos por macrorestrição, foram estabelecidas de acordo com os critérios propostos por Tenover *et al.* (1995). Assim, isolados com o mesmo perfil de macrorestrição foram considerados a mesma estirpe (*indistinguishable*); isolados que diferiram apenas num único evento genético, reflectido por diferenças de uma a três bandas foram considerados estreitamente relacionados entre si (*closely related*); os perfis de isolados que diferiram em quatro a seis bandas foram considerados indicativos de estirpes possivelmente relacionadas (*possibly related*); enquanto que sete ou mais bandas de diferença foram consideradas indicativas de isolados não inter-relacionados (*different*).

Foram atribuídas, aos diferentes tipos de PFGE obtidos, letras representando cada clone.

## A.5. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR E SEQUENCIAÇÃO

---

### A.5 Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR e sequenciação

Nalguns casos, nomeadamente aquando da descrição de novos integrões, foi necessário recorrer a um processo de clonagem por forma a determinar objectivamente a expressão do gene *bla<sub>TEM-2</sub>* e sua localização no novo elemento a ser descrito. Para tal utilizou-se o kit de clonagem *PCR-Script Cam Cloning Kit* (Stratagene) e um procedimento que passou por fases essenciais: purificação do produto de PCR, *polishing*, ligação, transformação, extracção de plasmídeos recombinantes e sequenciação.

#### A.5.1 Purificação dos produtos de amplificação

Os produtos resultantes das reacções de amplificação foram purificados utilizando o *StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, sendo eliminados, desta forma, primers, nucleótidos não incorporados, componentes do tampão e enzima.

#### A.5.2 Ligação dos produtos de amplificação ao vector de clonagem

Os produtos de amplificação, depois de purificados, foram clonados no vector *pPCR-Script Cam SK (+)* (Stratagene), que apresenta resistência ao cloranfenicol, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após a reacção de *polishing* (utilizado com o objectivo de se criarem extremidade "cegas" nos fragmentos de DNA que facilitam o processo de clonagem no vector), a ligação foi efectuada, utilizando-se 4  $\mu$ L de produto de amplificação purificado. Após incubação da reacção de ligação, durante 1h à temperatura ambiente e aquecimento a 65°C/10 min, colocaram-se os tubos em gelo e procedeu-se à reacção de transformação em células ultracompetentes.

#### A.5.3 Transformação dos plasmídeos recombinantes

As células ultracompetentes Epicurian coli XL10-Gold Kan (Stratagene), que apresentam resistência à tetraciclina e à canamicina, foram descongeladas em

gelo. De acordo com o protocolo, a 40  $\mu\text{L}$  de células adicionou-se 1,6  $\mu\text{L}$  de XL10-Gold  $\beta$ -mercaptoetanol (que aumenta a eficiência da reacção) e incubaram-se as células em gelo durante 10 min, agitando suavemente a cada 2 min. Posteriormente, adicionaram-se 2  $\mu\text{L}$  da reacção de ligação, misturando muito suavemente com as células competentes. Esta mistura foi colocada em gelo durante 30 min. Decorrido este tempo, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C durante 30 s e colocadas imediatamente em gelo durante 2 min. De seguida, adicionou-se à mistura 450  $\mu\text{L}$  de caldo NZY+ , pré-aquecido a 42°C, e incubou-se a 37°C com agitação (225-250 rpm), durante 1 h. O meio NZY+ é constituído por 10 g de amina NZ (hidrolisado de caseína), 5 g de extracto de levedura e 5 g de NaCl, por litro, com pH 7,5. Imediatamente antes da utilização, adicionam-se 12,5 mL de uma solução de  $\text{MgCl}_2$  a 1M, 12,5 mL de uma solução de  $\text{MgSO}_4$  a 1M e 20 mL de uma solução de glicose a 20% (p/v) (volumes relativos a 1 L de meio de cultura).

### A.5.4 Selecção dos transformantes

A partir da cultura bacteriana obtida anteriormente semearam-se placas de meio LB agar contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (X-Gal, Amersham Pharmacia Biotech), isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Alfa-gene ), 30 mg/L de cloranfenicol (Sigma) e 50 mg/L de ampicilina (Sigma) , usando volumes de suspensão de 100  $\mu\text{L}$ . As placas foram incunadas durante 18-24h a 37°C. Os transformantes podiam ser distinguidos como colónias brancas.

### A.5.5 Extracção e análise de restrição de plasmídeos recombinantes

Para confirmar a presença do plasmídeo recombinante foram seleccionadas colónias brancas de cada transformante para a extracção de plasmídeos, assim como uma colónia azul, que contém o plasmídeo sem inserto. A extracção foi realizada utilizando um *kit* comercial (*Wizard Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega). Posteriormente e com o intuito de se confirmar se os plasmídeos isolados dos transformantes continham inserto, efectuou-se uma digestão com a enzima de restrição EcoRI. Para um volume final de reacção de 20  $\mu\text{L}$  em água destilada estéril, juntaram-se 2  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima, 10  $\mu\text{L}$  de DNA

## A.6. SEQUENCIAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

---

plasmídico e 1  $\mu$ L de EcoRI (New England Biolabs). A reacção de digestão decorreu a 37°C, *overnight*. Num gel de agarose a 1% em tampão TBE, aplicaram-se os produtos resultantes da restrição, as respectivas soluções de plasmídeos não digeridos e solução de plasmídeo obtido de colónias azuis (sem inserto). Após electroforese, foi confirmada a presença do inserto no vector, seleccionando-se estes clones para sequenciação.

### A.6 Sequenciação do DNA e análise de sequências

De um modo geral, a caracterização nucleotídica dos produtos de PCR foi realizada através de uma estratégia de *primer-walking*, utilizando primers específicos, para posterior sequenciação. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o *GFX PCR purification kit* (Amersham Biosciences) e as sequências nucleotídicas determinadas, usando um sequenciador automático (4base lab, Alemanha).

As sequência nucleotídicas obtidas por sequenciação foram comparadas com outras descritas e depositadas na base de dados GenBank, utilizando o BLASTN como ferramenta de alinhamento de sequências. No caso dos novos integrões, descritos no presente trabalho, as respectivas sequências foram depositadas na base de dados GenBank através do programa SEQUIN (NCBI).

### A.7 Caracterização das regiões adjacentes aos integrões contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*

As sequências nucleotídicas adjacentes ao local de inserção dos integrões de class 1 contendo o gene *bla<sub>VIM-2</sub>* foram caracterizadas através de uma aproximação baseada na metodologia proposta por Sorensen *et al.* (1993). Basicamente, esta metodologia consistiu num PCR com dois *nested-primers* desenhados para a região do gene da integrase, aproximadamente a 400 bp e a 300 bp da região IRI. O primer da posição 400 bp foi biotinilado.

O primeiro passo consistiu na realização de 4 reacções de PCR utilizando os seguintes primers:

1. o primer biotilado (Int400) desenhado para hibridar na sequência de DNA conhecida
2. Int400, utilizado em conjunto com cada um dos seguintes primers randômicos: R1, R2, R3 e R4 (ver Tabela A.3 e A.4).

As reacções de amplificação foram realizadas num volume final de 50  $\mu\text{L}$ , utilizando 20 pmol dos respectivos primers, enzima de alta fidelidade (TripleMaster Polymerase Mix, Eppendorf), 0,2  $\mu\text{M}$  de dNTPs (Stratagene) e 2  $\mu\text{L}$  do DNA. Os parâmetros de amplificação consistiram num primeiro ciclo de 94°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 62°C/30 s e 72°C/3 min, e um período de extensão final de 72°C durante 10 min.

Após amplificação e obtenção de vários produtos de PCR biotilados, porém não visíveis em gel de agarose, estes produtos foram isolados de acordo com o seguinte procedimento:

1. 40  $\mu\text{L}$  de cada uma das 4 reacções de PCR acima descritas foram homogeneizadas com 40  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 200  $\mu\text{g}$  de Dynabeads M-280 Streptavidin (DynaL Biotech), previamente lavada com tampão BW (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 M NaCl) com a ajuda de um concentrador magnético
2. após incubação de 15 min à temperatura ambiente, os fragmentos de DNA ligados às Dynabeads foram lavados com tampão BW e desnaturados com 8  $\mu\text{L}$  de uma solução de NaOH 0,1 M, durante 10 min
3. um concentrador magnético foi utilizado para separar as Dynabeads, sendo o sobrenadante removido e separado para um tubo distinto
4. o sobrenadante, que contém o fragmento de DNA não biotilado, foi neutralizado com a adição de 4  $\mu\text{L}$  de HCl 0,2 M e 1  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, sendo o volume final ajustado para 30  $\mu\text{L}$ . Desta solução foram retirados 2  $\mu\text{L}$  para serem utilizados como DNA alvo para o segundo passo estratégico

O segundo passo consistiu numa reacção de PCR para cada uma das fontes de DNA alvo obtidas no passo anterior. Esta reacção foi realizada de acordo com

#### A.7. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES ADJACENTES AOS INTEGRÕES CONTENDO O GENE *BLA<sub>VIM-2</sub>*

---

as mesmas indicações descritas acima, porém utilizou-se um segundo primer específico (Int300) para a região conhecida do DNA em conjunto com um primer complementar (S1) à sequência tag 5' dos primers randômicos. Finalmente os produtos de PCR obtidos foram separados em gel de agarose, extraídos e purificados com o "kit" GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e sequenciados com o primer Int300.

Tabela A.3: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação

| Primer  | Sequência(5'-3')       | Aplicação                                                          | Referência                      |
|---------|------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Int5'CS | GGCATCCAGCAGCGAG       | deteção de integrões de classe I                                   | (Lévesque <i>et al.</i> , 1995) |
| Int3'CS | AACGAGACTTGACTGGA      | deteção de integrões de classe I                                   | (Lévesque <i>et al.</i> , 1995) |
| INT/5CS | CTTCTAGAAAACCGAGGATGC  | deteção e sequenciação de integrões de classe I                    | (Riccio <i>et al.</i> , 2000)   |
| INT/3CS | CTCTCTAGATTTTAATCGGATG | deteção e sequenciação de integrões de classe I                    | (Riccio <i>et al.</i> , 2000)   |
| INT-F   | GGCACTGGCGCTTACCAAC    | deteção do gene integrase( <i>intI</i> ) dos integrões de classe I | (Kerr <i>et al.</i> , 2002)     |
| INT-R   | GGCCGAGCGAGATCCTGCACG  | deteção do gene integrase( <i>intI</i> ) dos integrões de classe I | (Kerr <i>et al.</i> , 2002)     |
| VIP1    | ACTCACCCCATGAGTTTT     | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/IM</i>                         | (Cardoso <i>et al.</i> , 2002)  |
| VIP2    | ACCACTGACGCAATTTGTGTG  | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/IM</i>                         | (Cardoso <i>et al.</i> , 2002)  |
| VIM-IR  | ATGAAAGTCTCTGGAGAC     | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/IM</i>                         | (Mavroidi <i>et al.</i> , 2000) |
| VIMB    | ATGCTGTGTTGGTGGCATATC  | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/IM</i>                         | (Poirer <i>et al.</i> , 2000b)  |
| VIMF    | TGGGCGATTGACCCGATC     | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/IM</i>                         | (Poirer <i>et al.</i> , 2000b)  |
| RVIP2   | CACCAATGCTGAGTGGT      | sequenciação                                                       | Estc trabalho                   |
| OLG1    | CTACGCGAGAGTCTTIG      | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/MP</i>                         | (Senda <i>et al.</i> , 1996a)   |
| OLG2    | AACCGATTGCGTTACCAT     | deteção de genes <i>bla<sub>I</sub>/MP</i>                         | (Senda <i>et al.</i> , 1996a)   |
| OXAFP2  | TTCCCTACATCATGATTGT    | deteção de genes <i>bla<sub>OX</sub> A-24 like</i>                 | (Bou <i>et al.</i> , 2000b)     |
| OXARP1  | GTACTATCAAGTTGTGAA     | deteção de genes <i>bla<sub>OX</sub> A-24 like</i>                 | (Bou <i>et al.</i> , 2000b)     |

A.7. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES ADJACENTES AOS INTEGRÕES  
CONTENDO O GENE *BLA<sub>VIM-2</sub>*

Tabela A.4: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação

| Primer   | Sequência(5'-3')                    | Aplicação                                              | Referência                      |
|----------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------|
| AACAA4F  | TTGGGCAATACGGAGAAAGTGA              | sequenciação                                           | Este trabalho                   |
| AACAA7-F | AGCATGGGCTCGTGGTGG                  | sequenciação                                           | Este trabalho                   |
| aadA2R   | AACCAAGAAATCAATATCGC                | sequenciação                                           | Este trabalho                   |
| SPM-1F   | CTGCTTGAATTCATGGGCGC                | detecção de genes <i>bla<sub>SPM-1</sub></i>           | (Poirel <i>et al.</i> , 2004)   |
| SPM-1R   | CCTTTCCGGGACTTGAATC                 | detecção de genes <i>bla<sub>SPM-1</sub></i>           | (Poirel <i>et al.</i> , 2004)   |
| SeqA     | AGAGTTGATCTHGGYTAGA                 | sonda (6S-RNA                                          | (Héritier <i>et al.</i> , 2003) |
| SeqB     | ACGYTACCTGTTCAGACTTC                | sonda (6S-RNA                                          | (Héritier <i>et al.</i> , 2003) |
| Int400   | Biotin-ACAGAGAGGATCCGAGAG           | amplificação das regiões flangeadoras do in-<br>tegrão | Este trabalho                   |
| Int300   | GTGCTGGCCACTTCCGAC                  | amplificação das regiões flangeadoras do in-<br>tegrão | Este trabalho                   |
| R1       | CAGTTCAAGCTTCTCCAGGAATCGNNNNNNGGCCT | primer randômico                                       | R. Mendes(Comunicação pessoal)  |
| R2       | CAGTTCAAGCTTCTCCAGGAATCGNNNNNNGGCCT | primer randômico                                       | R. Mendes(Comunicação pessoal)  |
| R3       | CAGTTCAAGCTTCTCCAGGAATCGNNNNNNGGCCT | primer randômico                                       | R. Mendes(Comunicação pessoal)  |
| R4       | CAGTTCAAGCTTCTCCAGGAATCGNNNNNNGGCCT | primer randômico                                       | R. Mendes(Comunicação pessoal)  |
| SI       | GAATTCGTGAGCAAGTTGAATG              | primer complementar ao randômico                       | Este trabalho                   |

## Apêndice B

# Sequências submetidas ao Genbank

### B.1 *Pseudomonas aeruginosa* class 1 integron In100, partial sequence

|            |                                                                                                                                            |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LOCUS      | AY560837 4003 bp DNA linear BCT 23-DEC-2004                                                                                                |
| DEFINITION | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> class 1 integron In100, partial sequence.                                                                    |
| ACCESSION  | AY560837                                                                                                                                   |
| VERSION    | AY560837.1 GI:44894280                                                                                                                     |
| KEYWORDS   | .                                                                                                                                          |
| SOURCE     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                                                                              |
| ORGANISM   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;<br>Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> . |
| REFERENCE  | 1 (bases 1 to 4003)                                                                                                                        |
| AUTHORS    | Quinteira,S., Sousa,J.C. and Peixe,L.                                                                                                      |
| TITLE      | Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-{beta}-lactamase and a carbenicillinase, from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| JOURNAL    | Antimicrob. Agents Chemother. 49 (1), 451-453 (2005)                                                                                       |
| PUBMED     | 15616334                                                                                                                                   |
| REFERENCE  | 2 (bases 1 to 4003)                                                                                                                        |
| AUTHORS    | Quinteira,S. and Peixe,L.                                                                                                                  |
| TITLE      | Direct Submission                                                                                                                          |
| JOURNAL    | Submitted (27-FEB-2004) Laboratorio de Microbiologia, Faculdade de                                                                         |

## B.1. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLASS 1 INTEGRON IN100

---

```

Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto
4050, Portugal
Location/Qualifiers
FEATURES
    source      1..4003
                /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                /mol-type="genomic DNA"
                /db-xref="taxon:287"
    repeat-region <1..>4003
                /transposon="class 1 integron In100"
    gene        complement(<41..360)
                /gene="intI1"
    CDS         complement(<1..360)
                /gene="intI1"
                /codon-start=1
                /transl-table=11
                /product="integrase IntI1"
                /protein-id="AAS48660.1"
                /db-xref="GI:44894281"
                /translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLPTEQAYVHWVRAF
IRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALAALLFFYGKVLCTDLPWLQ
EIGRPRPSRRLLPVVLTDP"
    misc-recomb 496..502
                /note="core site"
    misc-feature 497..1408
                /note="blaVIM-2 gene cassette"
    gene        527..1327
                /gene="blaVIM-2"
    CDS         527..1327
                /gene="blaVIM-2"
                /codon-start=1
                /transl-table=11
                /product="VIM-2 metallo-beta-lactamase"
                /protein-id="AAS48661.1"
                /db-xref="GI:44894282"
                /translation="MFKLLSKLLVYL TASIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEV
RLYQIADGVWSHIATQSPDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQ
IGLPVTRAVSTHFHDDRVGVDVLRAGVATYASPSSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSS
SGDAVRFGPVELFYPGAHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADLAE
WPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVKAHNTNRSVVE"
    misc-recomb 1340..1346
                /note="inverse core site"
    misc-recomb 1405..1411
                /note="core site"
    misc-feature 1406..2068
                /note="aacA4 gene cassette"
    gene        1490..2008
                /gene="aacA4"
    CDS         1490..2008

```

## SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

/feature="AAC(6')-II"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="aminoglycoside (6') N-acetyltransferase"
/protein-id="AAS48662.1"
/db-xref="GI:44894283"
/translation="MTEHDLAMLYEWLNRSHIVEWWGGEEARPTLADVQEQLPSVLA
QESVTPYIAMLNGEPIGYAQSYVALGSGDGWEEETDPGVRGIDQSLANASQLGKGLG
TKLVRALVELLFNDPEVTIKIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPDGPVYVMVQ
TRQAFERTRSA"
misc-recomb 2003..2009
/note="inverse core site"
misc-recomb 2068..2074
/note="core site"
misc-feature 2069..3112
/note="blaPlb gene cassette"
gene 2138..3004
/gene="blaPlb"
CDS 2138..3004
/gene="blaPlb"
/note="carbenicillinase"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="PSE-1/CARB-2 beta-lactamase"
/protein-id="AAS48663.1"
/db-xref="GI:44894284"
/translation="MKFLLAFSLIPSVVFASSSKFQQVEQDVKAIEVLSARIGVSV
LDTQNGEYWDYNGNQRFPLTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVYSP
VIEKQVGQAITLDDACFATMTTSDNTAANIILSAVGGPKGVDTFLRQIGDKETRLDRI
EPDLNEGKLGDLRDTTTPKAIASLTNKLPLFGSALSEMNNQKLESWMVNNQVTGNLLRS
VLPAGWNIADRSAGGFGARSITAVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAERNDIAIVKIG
HSIFDVYTSQSR"
misc-recomb 3008..3014
/note="inverse core site"
misc-recomb 3112..3118
/note="core site"
misc-feature 3113..3968
/note="aadA2 gene cassette"
gene 3122..3913
/gene="aadA2"
CDS 3122..3913
/gene="aadA2"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="aminoglycoside adenylyltransferase"
/protein-id="AAS48664.1"
/db-xref="GI:44894285"

```

## B.1. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLASS 1 INTEGRON IN100

```

/translation="MRVAVTIEISNQLSEVLSVIERHLESTLLAVHLYGSADVGLKRP
YSDIDLLVTVAVKLDETRRALLNDLMEASAFPGESETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQ
DLFEALRETLKLWNSQPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAITGKIAPKDVAAADWAIKRLPA
QYQPVLLLEAKQAYLGQKEDHLASRADHLEEFIRFVKGEIIKSVGK"

misc-recomb      3915..3921
                  /note="inverse core site"
misc-feature      3969..>4003
                  /note="3' conserved segment"

ORIGIN
1      atccgggggtc agcaccaccg gcaagcgccg cgacggccga ggtcttccga tctcctgaag
61     ccagggcaga tccgtgcaca gcaccttgcc gtagaagaac agcaaggccg ccaatgcctg
121    acgatgcgtg gagaccgaaa ccttgcgctc gttcgccagc caggacagaa atgcctcgac
181    ttcgctgctg cccaagggtg ccgggtgacg cacaccgtgg aaacggatga aggcacgaac
241    ccagtggaca taagcctggt cggttggtaa gctgtaatgc aagtagcgta tgcgctcacg
301    caactgggtc agaaccttga ccgaacgcag cggtggttaac ggcgcagtgg cggttttcat
361    ggcttgttat gactgttttt ttgtacagtc tatgcctcgg gcatccaagc agcaagcgcg
421    ttacgcgctg ggtcgatggt tgatgttatg gagcagcaac gatgttacgc agcagggcag
481    tcgcctctaa acaaaagtta gccgcactca cccccatgga gttttgatgt tcaaactttt
541    gagtaagtta ttggtctatt tgaccgcgtc tatcatggct attgcgagtc cgtcgcgttt
601    ttccgtagat tctagcgggt agtatccgac agtcagcgaa attccggtcg gggagggtccg
661    gctttaccag attgccgatg gtgtttggtc gcatatcgca acgcagtcgt ttgatggcgc
721    agtctaccgc tccaatggtc tcattgtccg tgatggtgat gaggtcgttt tgattgatac
781    agcgtggggg gcgaaaaaca cagcggcact tctcggcgag attgagaagc aaattggact
841    tcctgtaacg cgtgcagtct ccacgcactt tcatgacgac cgcgtcgccg gcgttgatgt
901    ccttcggggc gctgggggtg caacgtacgc atcacgctcg acacgccggc tagccgaggt
961    agaggggaac gagattccca cgcactctct agaaggactc tcatcgagcg gggacgcagt
1021   gcgcttcggt ccagtagaac tcttctatcc tggtgctgcg cattcgaccg acaacttagt
1081   tgtgtacgtc ccgtctcgca gtgtgctcta tggtggttgt gcgatttatg agttgtcacg
1141   cacgtctcgc gggaaacgtg ccgatgccga tctgggtgaa tggccaccct ccattgagcg
1201   gattcaacaa cactaccggt aagcacagtt cgtcattccg gggcacggcc tgccggggcg
1261   tctagacttg ctcaagcaca caacgaatgt tgtaaaagcg cacacaaatc gctcagtcgt
1321   tgagtacgag gcagatgcgg cataacatga agttgcagcc gaccatcact ccgctgcgct
1381   ccgttctggc ggtgaaactt cggcgtagg  cattagaact tcacggcgga tttaaagaaa
1441   aggagaagac atcgtgacca acagcaacga ttccgtcaca ctgcgctca tgactgagca
1501   tgaccttgcg atgctctatg agtggctaaa tcgatctcat atcgtcgagt ggtggggcgg
1561   agaagaagca cgcccgacac ttgctgacgt acaggaacag tacttgccaa gcgttttagc
1621   gcaagagtcc gtcactccat acattgcaat gctgaatgga gagccgattg ggtatgccc
1681   gtcgtacgtt gctcttgga gcggggacgg atggtggga gaagaaaccg atccaggagt
1741   acgggaata  gaccagtcac tggcgaatgc atcacaactg ggcaaaggct tgggaaccaa
1801   gctggttcga gctctggtg agttgctgtt caatgatccc gaggtcacca agatccaaac
1861   ggaccgctcg ccgagcaact tgcgagcgat ccgatgtac  gagaaagcgg ggtttgagag
1921   gcaaggtacc gtaaccacc  cagatggctc agccgtgtac atggttcaaa cagccaggc
1981   attcgagcga acacgcagtg ttgcctaacc cttccatcga gggggacgtc caagggttg
2041   cgcccttggc cgccctcat  gtcaaacgtt agccatatta tggagcctca tgcttttata
2101   taaaatgtgt gacaatcaaa attatgggtt tacttacatg aagtttttat tggcattttc
2161   gcttttaata ccatccgtgg tttttgcaag tagttcaaag tttcagcaag ttgaacaaga
2221   cgtaagga  attgaagttt ctctttctgc tcgtataggt gtttcggttc ttgatactca

```

## SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

2281      aaatggagaa tattgggatt acaatggcaa tcagcgcttc cgttaacaa gtacttttaa
2341      aacaatagct tgcgctaaat tactatatga tgctgagcaa ggaaaaagta atcccaatag
2401      tacagtcgag attaagaaaag cagatcttgt gacctattcc cctgtaatag aaaagcaagt
2461      agggcaggca atcacactcg atgatgcgtg cttegcaact atgactacaa gtgataatac
2521      tgccgcaaat atcatcctaa gtgctgtagg tggcccaaaa ggcgttactg attttttaag
2581      acaaatgggg gacaaaagaga ctcgctctaga cgtattgag cctgatttaa atgaaggtaa
2641      gctcggtgat ttgagggata cgacaactcc taaggcaata gccagtactt tgaataaatt
2701      tttatttggt tccgcgctat ctgaaatgaa ccagaaaaaa tttagtctt ggatggtgaa
2761      caatcaagtc actggtaatt tactacgttc agtattgccg gcgggtagga acattgccga
2821      tcgctcaggt gctggcggat ttggtgctcg gagtattaca gcagtttgtt ggagttagca
2881      tcaagcccca attattgtga gcctctatct agctcaaaca caggcttcaa tggcagagcg
2941      aaatgatcgc attgttaaaa ttggtcattc aatttttgac gtttatacat cacagtcgcg
3001      ctgataaggc taacaaggcc atcaagttga cggcttttcc gtgccttggt ttgtggttta
3061      acgctacgct accacaaaac aatcaactcc aaagccgcaa cttatggcgg cgttagacat
3121      catgagggta gcggtgacca tcgaaatttc gaaccaacta tcagagggtc taagcgtcat
3181      tgagcggcat ctggaatcaa cgttgctggc cgtgcatttg tacggctccg cagtggatgg
3241      cggcctgaag ccatacagcg atattgattt gttggttact gtggccgtaa agcttgatga
3301      aacgacgcgg cgagcattgc tcaatgacct tatggaggct tcggctttcc ctggcgagag
3361      cgagacgctc cgcgctatag aagtcaccct tgcgtgcat gacgacatca tcccgtagcg
3421      ttatccggct aagcgcgagc tgcaatttgg agaatggcag cgcaatgaca ttcttgccgg
3481      tatcttcgag ccagccatga tcgacattga tctagctatc ctgcttacia aagcaagaga
3541      acatagcggt gccctggtag gtccggcagc ggaggaaatc tttgacccgg ttccctgaaca
3601      ggatctattc gaggcgctga gggaaacctt gaagctatgg aactcgcagc ccgactgggc
3661      cggcgatgag cgaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatt tggtagacgc caataaccgg
3721      caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgcoga ctgggcaata aaacgcctac ctgcccagta
3781      tcagcccgtc ttacttgaag ctaagcaagc ttatctggga caaaaagaag atcacttggc
3841      ctacgcgcga gatcacttgg aagaatttat tcgctttgtg aaaggcgaga tcatcaagtc
3901      agttggtaaa tgatgtctaa caattcgctc aagccgacgc cgctacgcgc ggcggcttaa
3961      ctccggcggt agatgcacta agcacataat tgctcacagc caa

```

## B.2 *Pseudomonas aeruginosa* class 1 integron In102 integrase (IntI1) gene, partial cds, aminoglycoside (6') N-acetyltransferase (aacA4), aminoglycoside (3') N-acetyltransferase (aacC1), and VIM-2 metallo beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>) genes, complete cds, and unknown gene

LOCUS AY775051 2652 bp DNA linear BCT 17-NOV-2004  
 DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* class 1 integron In102 integrase (IntI1) gene, partial cds, aminoglycoside (6') N-acetyltransferase (aacA4), aminoglycoside (3') N-acetyltransferase (aacC1), and VIM-2 metallo beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>) genes, complete cds, and unknown gene.  
 ACCESSION AY775051  
 VERSION AY775051.1 GI:55710273  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*  
 ORGANISM *Pseudomonas aeruginosa*  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2652)  
 AUTHORS Quinteira, S. and Peixe, L.  
 TITLE Characterization of *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integrons from *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2652)  
 AUTHORS Quinteira, S. and Peixe, L.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (08-OCT-2004) REQUIMTE, Laboratorio de Microbiologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050, Portugal  
 FEATURES  
     source 1..2652  
         /organism="Pseudomonas aeruginosa"  
         /mol-type="genomic DNA"  
         /db-xref="taxon:287"  
     repeat-region <1..>2652  
         /transposon="class 1 integron In102"  
     gene complement(<1..357)  
         /gene="IntI1"  
     CDS complement(<1..357)  
         /gene="IntI1"  
         /codon-start=1

## SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

/transl-table=11
/product="integrase"
/protein-id="AAV59010.1"
/db-xref="GI:55710274"
/translation="MKTSTAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSRLTEQAYVHWVRAF
IRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSASTHRQALAALLFFYGKVLCADLPWLQ
EIGRPSPSRRLPVVLTTP"
CDS      459..497
        /note="ORF11"
        /codon-start=1
        /transl-table=11
        /product="unknown"
        /protein-id="AAV59011.1"
        /db-xref="GI:55710275"
        /translation="MLRSRAVALKQS"
misc-recomb      493..499
        /note="core site"
misc-feature      494..1132
        /note="aacA4 cassette"
gene      518..1072
        /gene="aacA4"
CDS      518..1072
        /gene="aacA4"
        /note="AAC(6')-Ib"
        /codon-start=1
        /transl-table=11
        /product="aminoglycoside (6') N-acetyltransferase"
        /protein-id="AAV59012.1"
        /db-xref="GI:55710276"
        /translation="MTNSNDSVTLRMLTEHDLAMLYEWLNRSHIVEWWGGEARPTLA
DVQEQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPIGYAQSYVALGSGDGWEEETDPGVRGIDQS
LANASQLGKGLGTLKLRALVELLFNDPEVTKIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTV
TTPDGPVYVMVQTRQAFERTRSDA"
misc-recomb      complement(1067..1073)
        /note="inverse core site"
misc-recomb      1132..1138
        /note="core site"
misc-feature      1133..1708
        /note="aacC1 cassette"
gene      1148..1612
        /gene="aacC1"
CDS      1148..1612
        /gene="aacC1"
        /note="AAC(3')-I"
        /codon-start=1
        /transl-table=11
        /product="aminoglycoside (3') N-acetyltransferase"
        /protein-id="AAV59013.1"

```

## B.2. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLASS 1 INTEGRON IN102

```

/db-xref="GI:55710277"
/translation="MGIIRTCRLGPDQVKSMRAALDLFGREFGDVATYSQHQPDSYDL
GNLLRSKTFIALAAFDQEAUVGALAAAYLVPKFEQARSEIYIYDLAVSGEHRROGIATA
LINLLKHEANALGAYVIYVQADYGDDPAVALYTKLGIREVMHFDIDPSTAT"
misc-recomb      complement(1607..1613)
                  /note="inverse core site"
misc-recomb      1708..1714
                  /note="core site"
misc-feature      1709..2617
                  /note="blaVIM-2 cassette"
gene              1739..2539
                  /gene="blaVIM-2"
CDS               1739..2539
                  /gene="blaVIM-2"
                  /codon-start=1
                  /transl-table=11
                  /product="VIM-2 metallo beta-lactamase"
                  /protein-id="AAV59014.1"
                  /db-xref="GI:55710278"
                  /translation="MFKLLSKLLVYLTA SIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEV
RLYQIADGVWSHIATQSFDAVYPSNGLIVRDGDELLLDITAWGAKNTAALLAEIEKQ
IGLPVTRAVSTHFHDDRVGVDVLRAGVATYASPSRRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSS
SGDAVRFGFVELFYPGAHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAE
WPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVKAHNRSVVE"
misc-recomb      complement(2552..2558)
                  /note="inverse core site"
misc-feature      2618..>2652
                  /note="3'-conserved segment"

ORIGIN
1      cggggtcagc acgaccggca agcgccgcga cggccgaggt cttccgatct cctgaagcca
61     aggcagatcc gcgcacagca ccttgccgta gaagaacagc aaggccgccca atgcctgccg
121    atgtgtggat gccgaaacct tacgctcggt cgccagccaa gacaggaatg cctcgacttc
181    gctgctgccc aaggttgctg ggtgacgcac accgtggaaa cggatgaagg cacgaaccca
241    gtggacatac gcttgttcgg ttcgtaaaact gtaatgcaag tagcgatgac gctcacgcaa
301    ctggtccaga accttgaccg aacgcagcgg tggtaacggt gcagtgctgg ttttcatggc
361    ttgttatgac tgtttttttg tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcggtta
421    cgccgtgggt cgatgtttga tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagctg
481    ccctaaaaca aagttaggca tcacaaagta cagcatcgty accaacagca acgattccgt
541    cacactgcgc ctcatgactg agcatgacct tgcgatgctc tatgagtggc taaatcgatc
601    tcatatcgtc gagtgggtgg gcggagaaga agcacgcccc acacttgctg acgtacagga
661    acagtacttg ccaagcggtt tagcgcaaga gtccgtcact ccatacattg caatgctgaa
721    tggagagccg attgggtatg cccagtcgta cgttgctctt ggaagcgggg acggatgggtg
781    ggaagaagaa accgatccag gagtacgcgg aatagaccag tcactggcga atgcatacaca
841    actgggcaaa ggcttgggaa ccaagctggt tcgagctctg gttgagttgc tgttcaatga
901    tcccagagtc accaagatcc aaacggaccc gtcgcccagc aacttgccag cgatccgatg
961    ctacgagaaa gcggggtttg agaggcaagg taccgtaacc accccagatg gtccagccgt
1021   gtacatggtt caaacacgcc aggcattcga gcgaacacgc agtgatgcct aacccttcca
1081   tcgagggggga cgtccaaggg ctggcgccct tggccgcccc tcattgcaaa cgtaggtggg

```

## SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

1141      ctcaagtatg ggcatacttc gcacatgtag gctcggccct gaccaagtca aatccatgag
1201      ggctgctctt gatcttttcg gtcgtgagtt cggagacgta gccacctact cccaacatca
1261      gccggactcc gattacctcg ggaacttgct ccgtagtaag acattcatcg cgcttgctgc
1321      cttcgaccaa gaagcggttg ttggcgctct cgcgggttac gttctgacca agtttgagca
1381      agcgcgtagt gagatctata tctatgatct cgcagtcctc ggcgagcacc ggaggcaggg
1441      cattgccacc gcgctcatca atctcctcaa gcatgaggcc aacgcgcttg gtgcttatgt
1501      gatctacgtg caagcagatt acggtgacga tcccgcagtg gctctctata caaagttggg
1561      catacgggaa gaagtgatgc actttgatat cgaccaagt accgccacct aacaattcgt
1621      tcaagccgag atcgcttcgc ggccgcggag ttgttcggta aattgtcaca acgcccgccg
1681      cgcaaaagcg tccggcttaa ctcaggcggt atgcgcgact caccctcatg gagttttgat
1741      gttcaaaact ttgagtaagt tattggtcta ttgaccgcg tctatcatgg ctattgcgag
1801      tccgctcgct ttttcgtag attctagcgg tgagtatccg acagtacgcg aaattccggt
1861      cggggaggtc cggctttacc agattgccga tgggtgttgg tcgcatatcg caacgcagtc
1921      gtttgatggc gcagtctacc cgtccaatgg tctcattgtc cgtgatgggt atgagttgct
1981      tttgattgat acagcgtggg gtgcgaaaaa cacagcggca cttctcgcgg agattgagaa
2041      gcaaatggga cttcctgtaa cgcgtgcagt ctccacgcac tttcatgacg accgcgtcgg
2101      cggcggttat gtccttcggg cggctggggg ggcaacgtac gcataccgt cgacacgccg
2161      gctagccgag gtagagggga acgagattcc cacgcactct ctagaaggac tctcatcgag
2221      cggggacgca gtgcgcttcg gtccagtaga actcttctat cctggtgctg cgcattcgac
2281      cgacaactta gttgtgtacg tcccgctctg gagtgtgctc tatggtggtt gtgcgattta
2341      tgagttgtca cgcacgtctg cggggaaact gcccgatgcc gatctgctg aatggccac
2401      ctccattgag cggattcaac aacactacc ggaagcacag ttcgctatc cggggcacgg
2461      cctgccgggc ggtctagact tgctcaagca cacaacgaat gttgtaaaag cgcacacaaa
2521      tcgctcagtc gttgagtagc aggcagatgc ggcataacat gaagttgcag ccgaccatca
2581      ctccgctcgc ctccgttctg gcggtgaaac ttcggcggtta gatgcactaa gcacataatt
2641      gctcacagcc aa

```

**B.3 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* class 1 integron integrase (intI1) gene, partial cds, VIM-2 metallo-beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>) gene, complete cds, and quaternary ammonium compound-resistance protein (qacEdelta1) gene, partial cds**

LOCUS AY685199 1572 bp DNA linear BCT 27-APR-2005  
 DEFINITION *Pseudomonas pseudoalcaligenes* class 1 integron integrase (intI1) gene, partial cds, VIM-2 metallo-beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>) gene, complete cds, and quaternary ammonium compound-resistance protein (qacEdelta1) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY685199  
 VERSION AY685199.1 GI:50952948  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
 ORGANISM *Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1572)  
 AUTHORS Quinteira,S., Ferreira,H. and Peixe,L.  
 TITLE First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
 JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 49 (5), 2140-2141 (2005)  
 PUBMED 15855549  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1572)  
 AUTHORS Quinteira,S. and Peixe,L.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (13-JUL-2004) Servico de Microbiologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-Porto, Portugal  
 FEATURES  
     source 1..1572  
         /organism="Pseudomonas pseudoalcaligenes"  
         /mol-type="genomic DNA"  
         /isolate="E60"  
         /isolation-source="hospital wastewater"  
         /db-xref="taxon:330"  
     repeat-region <1..>1572  
         /transposon="class 1 integron"  
     gene complement(<1..348)  
         /gene="intI1"  
     CDS complement(<1..348)

# SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

/feature="intI1"
/feature="integrase intI1"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="integrase"
/protein-id="AAT90389.1"
/db-xref="GI:50952949"
/translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLRTEQAYVNWVRAF
IRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALALFFYGKVLCTDLPWLQ
EIGRPRPSRRLPVV"
misc-recomb 484..489
/feature="core site"
misc-feature 485..1393
/feature="blaVIM-2 gene cassette"
gene 515..1315
/feature="blaVIM-2"
CDS 515..1315
/feature="blaVIM-2"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="VIM-2 metallo-beta-lactamase"
/protein-id="AAT90390.1"
/db-xref="GI:50952950"
/translation="MFKLLSKLLVYLTA SIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEV
RLYQIADGVWHSIATQSF DGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQ
TGLPVTRAVSTHFHDDR VGGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSS
SGDAVRFGPVLFYPGA AHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAE
WPTSIERIQQHYPEAFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVKAH TNRSVVE"
misc-recomb 1328..1334
/feature="inverse core site"
gene 1502..>1572
/feature="qacEdelta1"
CDS 1502..>1572
/feature="qacEdelta1"
/codon-start=1
/transl-table=11
/product="quaternary ammonium compound-resistance protein"
/protein-id="AAT90391.1"
/db-xref="GI:50952951"
/translation="MKGWLFVLVIAIVGEVIATSALKS"

ORIGIN
1 caccaccggc aagcgccgag acggccgagg tcttccgata tcttgaagcc agggcagatc
61 cgtgcacagc accttgccgt agaagaacag caagcccgcc aatgcctgac gatgcgtgga
121 gaccgaaacc ttgcgctcgt tcgccagcca ggacagaaat gcctcgactt cgctgctgcc
181 caaggttgcc ggggtgacga caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc agttgacata
241 agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca actggctccag
301 aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gtttccatgg cttgttatga
361 ctgttttttt gtacagtcta tgcctcgggc atccaagcag caagcgcggt acgcgctggg

```

### B.3. *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES* CLASS 1 INTEGRON

---

```
421      tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagggcagtc gccctaaaac
481      aaagttatgc cgcactcacc cccatggagt tttgatgttc aaacttttga gtaagttatt
541      ggtctatttg accgcgtcta tcatggctat tgcgagtcgg ctcgcttttt ccgtagattc
601      tagcgggtgag tatccgacag tcagcgaaat tccggtcggg gaggtccggc tttaccagat
661      tgccgatggt gtttggtcgc atatcgcaac gcagtcgttt gatggcgag tctaccgctc
721      caatgggtctc attgtccgtg atgggtgatga gttgcttttg attgatacag cgtgggggtgc
781      gaaaaacaca gcggcacttc tcgcgagat tgagaagcaa attggacttc ctgtaacgcg
841      tgcagtctcc acgcactttc atgacgaccg cgtcggcggc gttgatgtcc ttcgggcggc
901      tggggtggca acgtacgcat caccgtcgac acgccggcta gccgaggtag aggggaacga
961      gattcccacg cactctctag aaggactctc atcgagcggg gacgcagtgc gcttcggtcc
1021     agtagaactc ttctatcctg gtgctgcgca ttcgaccgac aacttagttg tgtacgtccc
1081     gtctgcgagt gtgctctatg gtggttggtc gatttatgag ttgtcacgca cgtctgcggg
1141     gaacgtggcc gatgccgac tggtctgaatg gccacactcc attgagcgga ttcaacaaca
1201     ctacccggaa gcacagttcg tcattccggg gcacggcctg cggggcggtc tagacttgct
1261     caagcacaca acgaatggtg taaaagcgca cacaaatcgc tcagtcgttg agtagcaggc
1321     agatgcggca taacatgaag ttgcagccga ccatcactcc gctgcgctcc gttctggcgg
1381     ctgaacttcg gcgttagatg cactaagcac ataattgtc acagccaaac taccaggtca
1441     agtctgcttt tattattttt aagcgtgcat aataagccct acacaaattg ggagatatat
1501     catgaaaggc tggttttttc ttgttatcgc aatagttggc gaagtaatcg caacatccgc
1561     attaaaatct ag
```

**B.4 *Pseudomonas aeruginosa* transposon class 1 integron IN103 integrase (intI1) gene, partial cds, and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase II (aacA7), VIM-2 metallo-beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>), and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase Ib' (aacA4) genes, complete cds**

LOCUS AY954726 2620 bp DNA linear BCT 29-MAR-2005  
 DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* transposon class 1 integron IN103 integrase (intI1) gene, partial cds, and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase II (aacA7), VIM-2 metallo-beta-lactamase (*bla*<sub>VIM-2</sub>), and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase Ib' (aacA4) genes, complete cds.  
 ACCESSION AY954726  
 VERSION AY954726.1 GI:61742060  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*  
 ORGANISM *Pseudomonas aeruginosa*  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2620)  
 AUTHORS Quinteira, S. and Peixe, L.  
 TITLE Characterization of *bla*<sub>VIM-2</sub>-carrying integrons from *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2620)  
 AUTHORS Quinteira, S. and Peixe, L.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (07-MAR-2005) Servico de Microbiologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha, 164, Porto 4050-047, Portugal  
 FEATURES  
 source 1..2620  
 /organism="Pseudomonas aeruginosa"  
 /mol-type="genomic DNA"  
 /db-xref="taxon:287"  
 repeat-region <1..>2620  
 /transposon="class 1 integron IN103"  
 gene complement(<1..329)  
 /gene="intI1"  
 CDS complement(<1..329)  
 /gene="intI1"

#### B.4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLASS 1 INTEGRON IN103

---

```

        /note="IntI1"
        /codon-start=1
        /transl-table=11
        /product="integrase"
        /protein-id="AAX54875.1"
        /db-xref="GI:61742061"
        /translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSRLTEQAYVNWVRAF
        IRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALAAALFFYGKVLCTDLPWLQ
        EIGRPRPS"
misc-recomb      465..471
                  /note="core site"
misc-feature      466..1056
                  /note="aacA7 gene cassette"
gene              476..934
                  /gene="aacA7"
CDS               476..934
                  /gene="aacA7"
                  /note="AAC(6')-I1"
                  /codon-start=1
                  /transl-table=11
                  /product="6'-N-aminoglycoside acetyltransferase I1"
                  /protein-id="AAX54876.1"
                  /db-xref="GI:61742062"
                  /translation="MDSSPLVRPVETDSASWLSMRCELWPDGTCQEHQSEIAEFLSG
                  KVARPAAVLIHAVDPGEALGFAELSIIRPYAECEYSGNVAFLEGWYVVPARRQGVGVA
                  LVKAAEHWARGGCTEFASDTQLTNSASTSAHLAAGFTEVAQVRCFRKPL"
misc-recomb      951..957
                  /note="inverse core site"
misc-recomb      1056..1062
                  /note="core site"
misc-feature      1057..1965
                  /note="blaVIM-2 gene cassette"
gene              1087..1887
                  /gene="blaVIM-2"
CDS               1087..1887
                  /gene="blaVIM-2"
                  /codon-start=1
                  /transl-table=11
                  /product="VIM-2 metallo-beta-lactamase"
                  /protein-id="AAX54877.1"
                  /db-xref="GI:61742063"
                  /translation="MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEV
                  RLYQIADGVWSHIATQSPDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQ
                  IGLPVTRAVSTHFHDDRVGVDVLRAGVATYASPTRRLAEEVEGNEIPTHSLEGLSS
                  SGDAVRFGPVELFYPGAHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAE
                  WPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVKAHNTNRSVVE"
misc-recomb      1900..1906
                  /note="inverse core site"

```

# SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS AO GENBANK

```

misc-recomb      1965..1971
                  /note="core site"
misc-feature      1966..2604
                  /note="aacA4 gene cassette"
gene              1990..2544
                  /gene="aacA4"
CDS               1990..2544
                  /gene="aacA4"
                  /note="AAC(6')-Ib'"
                  /codon-start=1
                  /transl-table=11
                  /product="6'-N-aminoglycoside acetyltransferase Ib'"
                  /protein-id="AAx54878.1"
                  /db-xref="GI:61742064"
                  /translation="MTNSNDSVTLRLMTEHDLAMLYEWLNRSHIVEWVGGEARPTLA
DVQEQYLPVSLAQESVTPYIAMLNGEPIGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGVRGIDQS
LANASQLGKGLGTLKLRALVELLFNDPEVTKIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTV
TTPDGPVAVMVQTRQAFERTRSDA"
misc-recomb      2539..2545
                  /note="inverse core site"

ORIGIN
1      gacggccgag gtcttcgat ctcctgaagc cagggcagat ccgtgcacag caccttgccg
61     tagaagaaca gcaaggccgc caatgcctga cgatgcgtgg agaccgaaac cttgcgctcg
121    ttcgccagcc aggacagaaa tgcctcgact tcgctgctgc ccaagggtgc cgggtgacgc
181    acaccgtgga aacggatgaa ggcacgaacc cagttgacat aagcctgttc ggttcgtaaa
241    ctgtaatgca agtagcgtat gcgctcacgc aactggtcca gaaccttgac cgaacgcagc
301    ggtggtaacg gcgcagtggc ggttttcgat gcttggtatg actgtttttt tgtacagtct
361    atgcctcggg catccaagca gcaagcgcgt tacgcgctgg gtcgatgttt gatgttatgg
421    agcagcaacg atgttacgca gcagggcagt cgccttaaaa caaagttagg caccaatgga
481    tagttcgccg ctgcgcagc ctgttgaaac taccgattcg gccagttggc taagcatgcg
541    ctgtgagctg tggccagatg gcacatgtca agagcaccag tcagagatcg cagaatttct
601    gtccggaaaa gtcgcccggc ctgctgctgt cctcattgct gtagcaccgc acggagaagc
661    actagggttt gccgagcttt cgatccgccc gtatgcggag gagtgcctact ccggcaacgt
721    tgcgttcttg gagggttggg acgttgtgcc aagtgcgcgg cgtcaggggc taggtgtagc
781    tctggtaaaa gccgccgagc attgggctcg tggtcgcgga tgcaccgaat tcgcctccga
841    cactcaactt accaacagcg caagcacctc ggcgcacctg cgggctggat tcacggaggt
901    tgctcaagta cgctgcttcc ggaaaccggt gtgagggggc ccgcgttggg gcctaacaat
961    tcgttcaagc cgaacttgct tccttacacc aaagccatgg cagaaaaaagc ttgccatggc
1021   tttggctcca ctacgcaagt cggcttaact cgggcgttat gccgcactca cccccatgga
1081   gttttgatgt tcaaaacttt gagtaagtta ttggtctatt tgaccgcgtc tatcatggct
1141   attgcgagtc cgctcgcttt ttccgtagat tctagcgggt agtatccgac agtcagcgaa
1201   attccggtcg gggaggtccg gctttaccag attgccgatg gtgtttgggc gcatatcgca
1261   acgcagtcgt ttgatggcgc agtctaccgc tccaatggtc tcattgtccg tgatggtgat
1321   gagttgcttt tgattgatac agcgtggggg gcgaaaaaca cagcggcact tctcgcggag
1381   attgagaagc aaattggact tcctgtaacg cgtgcagtct ccacgcactt tcatgacgac
1441   cgctcggcgg gcgttgatgt ccttcggggc gctgggggtg caacgtacgc atcaccgtcg
1501   acacgccggc tagccgaggt agaggggaac gagattccca cgcactctct agaaggactc
1561   tcatcgagcg gggacgcagt gcgcttcggt ccagtagaac tcttctatcc tgggtcgtcg

```

#### B.4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLASS 1 INTEGRON IN103

---

```
1621      cattcgaccg acaacttagt tgtgtacgtc cegtctgcga gtgtgctcta tggagggtgt
1681      gcgatttatg agttgtcacg cacgtctgcg gggaaactgg ccgatgccga tctggctgaa
1741      tggcccacct ccattgagcg gattcaacaa cactaccggg aagcacagtt cgtcattccg
1801      gggcacggcc tgccggggcg tctagacttg ctcaagcaca caacgaatgt tgtaaaagcg
1861      cacacaaatc gctcagtcgt tgagtagcag gcagatgcgg cataacatga agttgcagcc
1921      gaccatcact cegctgcgct cegtctctggc ggctgaactt cggcgtagg catcacaaag
1981      tacagcatcg tgaccaacag caacgattcc gtcacactgc gcctcatgac tgagcatgac
2041      cttgcgatgc tctatgagtg gctaaatcga tctcatatcg tcgagtggtg gggcggagaa
2101      gaagcacgcc cgacacttgc tgacgtacag gaacagtact tgccaagcgt tttagcgcaa
2161      gagtccgtca ctccatacat tgcaatgctg aatggagagc cgattgggta tgcccagtcg
2221      tacgttgctc ttggaagcgg ggacggatgg tgggaagaag aaaccgatcc aggagtacgc
2281      ggaatagacc agtcactggc gaatgcatca caactgggca aaggcttggg aaccaagctg
2341      gttcgagctc tggttgagtt gctgttcaat gatcccaggg tcaccaagat ccaaacggac
2401      ccgtcgccga gcaacttgcg agcgatccga tgctacgaga aagcggggtt tgagaggcaa
2461      ggtaccgtaa ccacccacaga tgggccagcc gtgtacatgg ttcaaacacg ccaggcattc
2521      gagcgaacac gcagtgatgc ctaacccttc catcgagggg gacgtccaag ggtggcgccc
2581      cttggccgcc cctcatgtca aacgttagat gcactaagca
```

## Bibliografia Geral

- AFZAL-SHAH, M. & LIVERMORE, D., 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**: 576–577.
- AFZAL-SHAH, M., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 583–588.
- ANDRADE, S., JONES, R., GALES, A. & SADER, H., 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme (1997-2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 140–141.
- APPLEMAN, M., BELZBERG, H., CITRON, D., HESELTINE, P., YELLIN, A., MURRAY, J. & BERNE, T., 2000. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1035–1040.
- ARAKAWA, Y., MURAKAMI, M., SUZUKI, K., ITO, H., WACHAROTAYANKUN, R., OHSUKA, S., KATO, N. & OHTA, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 1612–1615.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- ARMSTRONG, J. L., SHIGENO, D. S., CALOMIRIS, J. J. & SEIDLER, R. J., 1981. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **42**(2): 277–283.
- AUBRON, C., POIREL, L., ASH, R. & NORDMANN, P., 2005. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. Rivers. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 260–264.
- BAHAR, G., MAZZARIOL, A., KONCAN, R., MERT, A., FONTANA, R., ROSOLINI, G. M. & CORNAGLIA, G., 2004. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 282–283.
- BELLIDO, F., VEUTHEY, C. & BLASER, J., 1990. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **25**: 57–68.
- BENNETT, P., 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 1–4.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. & TOWNER, K., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **9**: 148–165.
- BERT, F., BRANGER, C. & LAMBERT-ZECHOVSKY, N., 2002. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamases genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 11–18.
- BITO, A. & SUSANI, M., 1994. Revised analysis of *aadA2* gene of plasmid pSa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 1172–1175.
- BORGSMANN, S., WOLZ, C., GRÖBNER, S., AUTENRIETH, I., HEEG, P., GÖRKE, C., MÜLLER, K., KYME, P. & MARSCHAL, M., 2004. Metallo- $\beta$ -lactamase expressing multi-resistant *Acinetobacter baumannii* transmitted in the operation area. *Journal of Hospital Infection* **57**: 308–315.

- BOU, G., CERVERÓ, G., DOMÍNGUEZ, M., QUEREDA, C. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000a. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3299–3305.
- BOU, G., OLIVER, A. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J., 2000b. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1556–1561.
- BRADFORD, P., BRATU, S., URBAN, C., VISALLI, M., MARIANO, N., LANDMAN, D., RAHAL, J., BROOKS, S., CEBULAR, S. & QUALE, J., 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamase in New York City. *Clinical Infectious Diseases* **39**: 55–60.
- BRADFORD, P., URBAN, C., MARIANO, N., PROJANE, S., RAHAL, J. & BUSH, K., 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 563–569.
- BROWN, S. & AMYES, S., 2005. The sequences of seven classe D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 326–329.
- BROWN, S., YOUNG, H. & AMYES, S., 2005. Characterization of OXA-51, a novel classe D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 15–23.
- BUSH, K., 1989. Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 271–276.
- BUSH, K., 1998. Metallo- $\beta$ -lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Diseases* **27**: S48–S53.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- BUSH, K., JACOBY, G. A. & MEDEIROS, A. A., 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 1211–1233.
- CARDOSO, O., LEITÃO, R., FIGUEIREDO, A., SOUSA, J. C., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93–97.
- CASELL, G. H., 1995. ASM task force urges broad program on antimicrobial resistance. *ASM News* **61**(3): 116–120.
- CASTANHEIRA, M., TOLEMAN, M., JONES, R., SCHMIDT, F. & WALSH, T., 2004. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4654–4661.
- CATCHPOLE, C., ANDREWS, J., BRENWALD, N. & WISE, R., 1997. A reassessment of the in vitro activity of colistin sulphomethate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**: 255–260.
- CDCP, 2002. *Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of Escherichia coli O157:H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- CHOI, Y., PARK, D., PARK, S., YUM, J., YONG, D., LEE, K. & CHONG, Y., 2005. Evaluation of imipenem disk Hodge test and double disk synergy tests to detect SIM-1-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* isolates. Programme and abstracts of the 45<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- CHU, Y., AFZAL-SHAH, M., HOUANG, E. T., PALEPOU, M. I., LYON, D. J., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2001. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong-Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 710–714.

- COHEN, M. L., 1994. Antimicrobial resistance: prognosis for public health. *Trends Microbiol.* **2**: 422–425.
- COLLIS, C. M. & HALL, R. M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 155–162.
- COLLIS, C. M., RECCHIA, G. D., KIM, M.-J., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase. *International Journal of Bacteriology* **183**: 2535–2542.
- CONCEIÇÃO, T., BRÍZIO, A., DUARTE, A. & BARROS, R., 2005. First isolation of *bla<sub>VIM-2</sub>* in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 476.
- CORBELLA, X., MONTERO, A., PUJOL, M., DOMÍNGUEZ, M., AYATS, J., ARGERICH, M., GARRIGOSA, F., ARIZA, J. & GUDIOL, F., 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4086–4095.
- CORNAGLIA, G., MAZZARIOL, A., LAURETTI, L., ROSSOLINI, G. M. & FONTANA, R., 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- $\beta$ -lactamase. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 1119–1125.
- CORNAGLIA, G., RICCIO, M. L., MAZZARIOL, A., LAURETTI, L., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G. M., 1999. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* **353**: 899–900.
- CORPET, D., 1998. Viande: après les hormones, les antibiotiques? *La Recherche* **314**: 59–61.
- CRESPO, M. P., WOODFORD, N., SINCLAIR, A., KAUFMANN, M. E., TURTON, J., GLOVER, J., VELEZ, J. D., CASTAÑEDA, C. R., RECALDE, M. & LIVERMORE, D. M., 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas*

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5094–5101.
- CRISTINO, M., CALADO, E., CALHEIROS, I., COSTA, D., COSTA, M., DIOGO, J., FELÍCIO, M., FERRO, M., FONSECA, J., GUIMARÃES, M., LITO, L., MARQUES, J., MARQUES, M., MARTINS, F., PAIS, M., PINTO, M., RAMOS, M., RIBEIRO, J., RODRIGUES, L., SALGADO, M., SIMÕES, J., SOBRAL, M. & TOSCANO, C., 1996. Estudos multicêntricos de microrganismos isolados e de resistência aos antimicrobianos em dez hospitais portugueses em 1994. *Acta Médica Portuguesa* **9**: 141–150.
- CUCHURAL, G., MALAMY, M. & TALLY, F., 1986.  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**: 645–648.
- DA SILVA, G., LEITÃO, R. & PEIXE, L., 1999. Emergence of carbapenem-hydrolysing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 2109–2110.
- DA SILVA, G., QUINTEIRA, S., BÉRTOLO, E., SOUSA, J. C., GALLEGÓ, L., DUARTE, A. & PEIXE, L., 2004. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 255–258.
- DA SILVA, G. J., CORREIA, M., VITAL, C., RIBEIRO, G., SOUSA, J. C., LEITÃO, R., PEIXE, L. & DUARTE, A., 2002. Molecular characterization of *bla*<sub>IMP-5</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiology Letters* **215**: 33–39.
- DARWIN, C., 1859. *On the origin of species*. John Murray, Londres.
- DAVIES, J. E., 1993. Grandeur et décadence des antibiotiques. *La Recherche* **24**: 1354–1361.
- DEVER, L. A. & DERMODY, T. S., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* **151**: 886–895.

- DOCQUIER, J., RICCIO, M., MUGNAIOLI, C., LUZZARO, F., ENDIMIANI, A., TONIOLO, A., AMICOSANTE, G. & ROSSOLINI, G., 2003. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 1522–1528.
- DONALD, H. M., SCAIFE, W., AMYES, S. G. B. & YOUNG, H.-K., 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 196–199.
- DUDLEY, M., 1995. Bacterial resistance mechanisms to  $\beta$ -lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy* **15**: 9S–14S.
- FEINMAN, S. E., 1998. Antibiotics in animal feed – drug resistance revisited. *ASM News* **64**(1): 24–30.
- FERNANDEZ-CUENCA, F., MARTINEZ-MARTINEZ, L., CONEJO, M., AYALA, J., PEREA, E. & PASCUAL, A., 2003. Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 565–574.
- FINCH, R. G., 1998. Antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**: 125–128.
- FLUIT, A. C. & SCHMITZ, F. J., 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* **18**: 761–770.
- GACAR, G., MIDILLI, K., KOLAYLI, F., ERGEN, K., GUNDES, S., HOSOGLU, S., KARADENIZLI, A. & VAHABOGLU, H., 2005. Genetic and enzymatic properties of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 4400–4403.
- GALANI, I., SOULI, M., CHRYSSOULI, Z., KATSALA, D. & GIAMARELLOU, H., 2004. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- both metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase IBC-1. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 757–760.
- GALANI, I., SOULI, M., CHRYSOULI, Z., ORLANDOU, K. & GIAMARELLOU, H., 2005. Characterization of a new integron containing *bla*<sub>VIM-1</sub> and *aac*(6')-IIc in a *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 634–638.
- GALES, A., BIEDENBACH, D., WINOKUR, P., HACEK, D., PFALLER, D. & JONES, R., 2001a. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f  $\beta$ -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **39**: 125–127.
- GALES, A., MENEZES, L., SILBERT, S. & SADER, H., 2003a. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 699–702.
- GALES, A., REIS, A. & JONES, R., 2001b. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 183–190.
- GALES, A., TOGNIM, M., REIS, A., JONES, R. & SADER, H., 2003b. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **45**: 77–79.
- GALLEGU, L. & TOWNER, K. J., 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 741–77.
- GALLEN, M., LAMOTTE-BRASSEUR, J., ROSSOLINI, G. M., SPENCER, J., DIDEBERG, O. & FRÈRE, J. M., 2001. Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 660–663.

- GARAU, G., GARCIA-SAEZ, I., BEBRONE, C., ANNE, C., MERCURI, P., GALLEN, M., FRÈRE, J. M. & DIDEBERG, O., 2004. Update of the standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 2347–2349.
- GARAU, G., GUILMI, A. & HALL, B., 2005. Structure-based phylogeny of the metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2778–2784.
- GAUTOM, R., 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2977–2980.
- GIAKKOUPI, P., PETRIKKOS, G., TZOUVELEKIS, L. S., TSONAS, S., THE WHONET GREECE STUDY GROUP, LEGAKIS, N. J. & VATOPOULOS, A. C., 2003a. Spread of integron-associated VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 822–825.
- GIAKKOUPI, P., XANTHAKI, A., KANELOPOULOU, M., VLAHAKI, A., MIRIAGOU, V., KONTOU, S., PAPAFRAGGAS, E., MALAMOU-LADA, H., TZOUVELEKIS, L., LEGAKIS, N. & VATOPOULOS, A., 2003b. VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 3893–3896.
- GIAMARELLOU, H., 2002. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 229–233.
- GIBB, A., TRIBUDDHARAT, C., MOORE, R., LOUIE, T., KRULICKI, W., LIVERMORE, D., PALEPOU, M. & WOODFORD, N., 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*<sub>IMP</sub> allele, *bla*<sub>IMP-7</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 255–258.
- GISKE, C., RYLANDER, M. & KRONVALL, G., 2003. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 3034–3035.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- GOMBAC, F., RICCIO, M., ROSSOLINI, G., LAGATOLLA, C., TONIN, E., MONTI-BRAGADIN, C., LAVENIA, A. & DOLZANI, L., 2002. Molecular characterization in integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 3665–3668.
- GOTOH, N., TSUJIMOTO, H., POOLE, K., YAMAGISHI, J. & NISHINO, T., 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 2567–2569.
- GOTOH, N., TSUJIMOTO, H., TSUDA, M., OKAMOTO, K., NOMURA, A., WADA, T., NAKAHASHI, M. & NISHINO, T., 1998. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in  $\Delta mexA-mexB-oprM$  mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 1938–1943.
- GRUNDMAN, H. J., TOWNER, K. J., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., MAHER, N., SEIFERT, H. & VANECHOUTTE, M., 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 3071–3077.
- GUERIN, F., HENEGAR, C., SPIRIDON, G., LAUNAY, O., SALMON-CERON, D. & POYART, C., 2005. Bacterial prostatitis due to *Pseudomonas aeruginosa* harbouring the *bla<sub>IMI-2</sub>* metallo- $\beta$ -lactamase gene from Saudi Arabia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**: 601–602.
- HALL, B., SALIPANTE, S. & BARLOW, M., 2003. The metallo- $\beta$ -lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *Journal of Molecular Evolution* **57**: 249–254.
- HALL, B., SALIPANTE, S. & BARLOW, M., 2004. Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamases. *Journal of Molecular Evolution* **59**: 133–141.

- HANSON, N., HOSSAIN, A., BUCK, L., MOLAND, E. & THOMSON, K., 2004. The first occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* in the United States (US) producing an IMP-metallo- $\beta$ -lactamase (MBL). Programme and abstracts of the 44<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- HAWKEY, P., XIONG, J., YE, H., LI, H. & M'ZALI, F., 2001. Occurrence of a new metallo- $\beta$ -lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiology Letters* **194**: 53–57.
- HENRICHFREISE, B., WIEGAND, I., SHERWOOD, K. & WIEDEMANN, B., 2005. Detection of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 1668–1669.
- HÉRITIER, C., DUBOUX, A., POIREL, L., MARTY, N. & NORDMANN, P., 2005a. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 115–118.
- HÉRITIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 268–273.
- HÉRITIER, C., POIREL, L., LAMBERT, T. & NORDMANN, P., 2005b. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 3198–3202.
- HSUEH, P.-R., TENG, L.-J., CHEN, C.-Y., CHEN, W.-H., YU, C.-J., HO, S.-W. & LUH, K.-T., 2002. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 827–832.
- ITO, H., ARAKAWA, Y., OHSUKA, S., WACHROTAYANKUN, R., KATO, N. & OHTA, M., 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinical isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 824–829.
- IYOBE, S., KUSADOKORO, H., OZAKI, J., MATSUMURA, N., MINAMI, S., HARUTA, S., SAWAI, T. & O'HARA, K., 2000. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 2023–2027.
- IYOBE, S., KUSADOKORO, H., AAND S. YOMODA, A. T., OKUDO, T., NAKAMURA, A. & O'HARA, K., 2002. Detection of a variant metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and a *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2014–2016.
- JACOBY, G. A. & ARCHER, G. L., 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine* **324**(9): 601–612.
- JEON, B.-C., JEONG, S., BAE, I., KWON, S., LEE, K., YOUNG, D., LEE, J., SONG, J. & LEE, S., 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23  $\beta$ -lactamase in Korea. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 2241–2245.
- JEONG, S. H., LEE, K., CHONG, Y., YUM, J. H., LEE, S. H., CHOI, H. J., KIM, J. M., PARK, K. H., HAN, B. H., LEE, S. W. & JEONG, T. S., 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 397–400.
- JONES, R., ANDEREGG, T., SWENSON, J. & GROUP, T. Q. C. W., 2005a. Quality control guidelines for testing gram-negative control strains with polymyxin B and colistin (polymyxin E) by standardized methods. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 925–927.
- JONES, R., BIEDENBACH, D., SADER, H., FRITSCH, T., TOLEMAN, M. & WALSH, T., 2005b. Emerging epidemic of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **51**: 77–84.

- KADO, C. I. & LIU, S. T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology* **145**: 1365–1373.
- KATRAGKOU, A. & ROILIDES, E., 2005. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with colistin. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4916–4917.
- KAYSER, F. H., 1993. Evolution of resistance in microorganisms of human origin. *Veterinary Microbiology* **35**: 257–267.
- KERRN, M. B., KLEMMENSEN, T., FRIMODT-MOLLER, N. & ESPERSEN, F., 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**: 513–516.
- KISKA, D. L. & GILLIGAN, P. H., 2003. *Pseudomonas*. In *Manual of Clinical Microbiology* (Eds. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & R. H. Tenover), pp. 719–728, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- KÜMMERER, K., 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 311–320.
- KOH, T., SNG, L.-H., BABINI, G., WOODFORD, N., LIVERMORE, D. & HALL, L., 2001. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Singapore producing IMP-1  $\beta$ -lactamase and lacking an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1939–1940.
- KOH, T., WANG, G. & SNG, L.-H., 2004. IMP-1 and a novel metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 2334–2336.
- LAGATOLLA, C., TONIN, E., MONTI-BRAGADIN, C., DOLZANI, L., GOMBAC, F., BEARZI, C., EDALUCCI, E., GIONECHETTI, F. & ROSSOLINI, G., 2004. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospitals. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 535–538.
- LARAKI, N., FRANCESCHINI, N., ROSSOLINI, G. M., SANTUCCI, P., MEUNIER, C., PAUW, E., AMICOSANTE, G., FRÈRE, J. M. & GALLEN, M., 1999. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 813–817.
- LAURETTI, L., RICCIO, M. L., MAZZARIOL, A., CORNAGLIA, G., AMICOSANTE, G., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G. M., 1999. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1584–1590.
- LEDEBERG, J., 1997. Infectious diseases as an evolutionary paradigm. *Emerging Infectious Disease* **3**: 417–423.
- LEE, K., HA, G., SHIN, B., KIM, J., KANG, J., JANG, S., YONG, D., CHONG, Y. & THE KOREAN NATIONWIDE SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE (KONSAR) GROUP, 2004. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **50**: 51–58.
- LEE, K., LEE, W., UH, Y., HA, G., CHO, J., CHONG, Y. & THE KOREAN NATIONAL SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GROUP, 2003. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerging Infectious Diseases* **9**: 868–871.
- LEE, K., LIM, J. B., YUM, J. H., YONG, D., CHONG, Y., KIM, J. M. & LIVERMORE, D. M., 2002. *bla<sub>VIM-2</sub>* cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* iso-

- lates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1053–1058.
- LEVY, S. B., 1998a. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* **278**(3): 32–39.
- LEVY, S. B., 1998b. Multidrug resistance - a sign of the times. *New England Journal of Medicine* **338**(19): 1376–1378.
- LI, J., COULTHARD, K., MILNE, R., NATION, R., CONWAY, S., PECKHAM, D., ETHERINGTON, C. & TURNIDGE, J., 2003. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 987–992.
- LIBISCH, B., GACS, M., CSISZÁR, K., MUZSLAY, M., RÓKUSZ, L. & FÜZI, M., 2004. Isolation of an integron-borne *bla<sub>IMI-4</sub>* type metallo- $\beta$ -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 3576–3578.
- LIU, S.-L., HESSEL, A. & SANDERSON, K. E., 1993. Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 6874–6878.
- LIVERMORE, D. M., 1992. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 2046–2048.
- LIVERMORE, D. M., 1993. Carbapenemases: the next generation of  $\beta$ -lactamases? *ASM News* **59**: 129–135.
- LIVERMORE, D. M., 1997. Acquired carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**: 673–676.
- LIVERMORE, D. M., 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 247–250.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- LIVERMORE, D. M., 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* **34**: 634–640.
- LIVERMORE, D. M., MUSHTAQ, S. & WARNER, M., 2005. Selectivity of ertapenem for *Pseudomonas aeruginosa* mutants cross-resistant to other carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 306–311.
- LIVERMORE, D. M., SEFTON, A. & SCOTT, G., 2003. Properties and potential of ertapenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 331–344.
- LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N., 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology* **3**: 489–495.
- LIVINGSTONE, D., GILL, M. J. & WISE, R., 1995. Mechanisms of resistance to carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**: 1–5.
- LOLANS, K., QUEENAN, A., BUSH, K., SAHUD, A. & QUINN, J., 2005. First nosocomial outbreak of Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 3538–3540.
- LOMBARDI, G., LUZZARO, F., DOCQUIER, J., RICCIO, M., PERILLI, M., COLLI, A., AMICOSANTE, G., ROSSOLINI, G. & TONIOLO, A., 2002. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 4051–4055.
- LOPEZ-OTSOA, F., GALLEG0, L., TOWNER, K. J., TYSALL, L., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M., 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 4741–4743.
- LUZZARO, F., DOCQUIER, J., COLINON, C., A. ENDIMIANI, LOMBARDI, G., AMICOSANTE, G., ROSSOLINI, G. & TONIOLO, A., 2004a. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4

- metallo- $\beta$ -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 648–650.
- LUZZARO, F., ENDIMIANI, A., DOCQUIER, J., MUGNAIOLI, C., BONSIGNORI, M., AMICOSANTE, G., ROSSOLINI, G. & TONIOLO, A., 2004b. Prevalence and characterization of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **48**: 131–135.
- LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C. & ROY, P. H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 185–191.
- MARTINEZ-FREIJO, P., FLUIT, A. C., SCHMITZ, F.-J., VERHOEF, J. & JONES, M. E., 1999. Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 686–689.
- MASCARETTI, O. A., 2003. *Bacteria versus antibacterial agents. An integrated approach*. American Society For Microbiology, Washington D. C., 1st edn.
- MAVROIDI, A., TSAKRIS, A., TZELEPI, E., POURNARAS, S., LOUKOVA, V. & TZOUVELEKIS, L. S., 2000. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 1041–1042.
- MAYNARD, C., FAIRBROTHER, J. M., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIÈRE, S. & HAREL, J., 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 3214–3221.
- MENDES, R., CASTANHEIRA, M., GARCIA, P., GUZMAN, M., TOLEMAN, M., WALSH, T. & JONES, R., 2004a. First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1433–1434.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- MENDES, R., TOLEMAN, M., RIBEIRO, J., SADER, H., JONES, R. & WALSH, T., 2004b. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4693–4702.
- MINAMI, S., AKAMA, M., WATANABE, Y., NARITA, H., IYOBE, S. & MITSUHASHI, S., 1996. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**: 433–444.
- MIRIAGOU, V., TZELEPI, E., GIANNELI, D. & TZOUVELEKIS, L., 2003a. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 395–397.
- MIRIAGOU, V., TZOUVELEKIS, L., ROSSITER, S., TZELEPI, E., ANGULO, F. & WHICHARD, J., 2003b. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to Plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 1297–1300.
- MOELLERING, R. C., 1998. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clinical Infectious Diseases* **27**(Supp 1): S135–S140.
- MOLAND, E. S., HANSON, N. D., HERRERA, V. L., BLACK, J. A., LOCKHART, T. J., HOSSAIN, A., JOHNSON, J. A., GOERING, R. V. & THOMSON, K. S., 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 711–714.
- NAAS, T., POIREL, L. & NORDDMANN, P., 1999. Molecular characterization of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenyltransferase gene cassette, *aadA6*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1489**: 445–451.

- NAAS, T., VANDEL, L., SOUGAKOFF, W., LIVERMORE, D. M. & NORDMANN, P., 1994. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 1262–1270.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement M100-S12. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Sixth edition: approved standard M7-A6. Tech. rep., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- NISHIO, H., KOMATSU, M., SHIBATA, N., SHIMAKAWA, K., SUEYOSHI, N., URA, T., SATOH, K., TOYOKAWA, M., NAKAMURA, T., WADA, Y., ORITA, T., KOFUKU, T., YAMASAKI, K., SAKAMOTO, M., KINOSHITA, S., AIHARA, M. & ARAKAWA, Y., 2004. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5256–5263.
- NORDMANN, P., MARIOTTE, S., NAAS, T., LABIA, R. & NICOLAS, M., 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**: 939–946.
- NORDMANN, P. & POIREL, L., 2002. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* **8**: 321–331.
- NOVAIS, C., COQUE, T. M., FERREIRA, H., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant *Enterococci* from hospital sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3364–3368.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- OBRITSCH, M., FISH, D., MACLAREN, R. & JUNG, R., 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4606–4610.
- OH, E.-J., LEE, S., PARK, Y.-J., PARK, J., KIM, S.-I., KANG, M. & KIM, B., 2003. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 411–418.
- OLIVE, D. M. & BEAN, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1661–1669.
- OSANO, E., ARAKAWA, Y., WACHAROTAYANKUN, R., OHTA, M., HORII, T., ITO, H., YOSHIMURA, F. & KATO, N., 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 71–78.
- OUDEKIRK, J., NORD, J., TURETT, G. & KISLAK, J., 2003. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 2659–2662.
- PAGANI, L., COLINON, C., MIGLIAVACCA, R., LABONIA, M., DOCQUIER, J.-D., NUCLEO, E., SPALLA, M., BERGOLI, M. & ROSSOLINI, G., 2005. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 3824–3828.
- PAI, H., KIM, J.-W., KIM, J., LEE, J. H., CHOE, K. W. & GOTOH, N., 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 480–484.

- PALLECCHI, L., RICCIO, M., DOCQUIER, J., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G., 2001. Molecular heterogeneity of *bla<sub>IM-2</sub>*-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters* **195**: 145–50.
- PARK, D., CHOI, Y., YUM, J., YONG, D., LEE, K. & CHONG, Y., 2005. Further dissemination of novel metallo-β-lactamase (MBL), SIM-1-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. Programme and abstracts of the 45<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- PARTRIDGE, S. R., RECCHIA, G. D., SCARAMUZZI, C., COLLIS, C. M., STOKES, H. W. & HALL, R. M., 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* **146**: 2855–2864.
- PASTERAN, F., FACCONI, D., PETRONI, A., RAPOPORT, M., GALAS, M., VÁZQUEZ, M. & PROCOPIO, A., 2005. Novel variant (*bla<sub>VIM-11</sub>*) of the metallo-β-lactamase *bla<sub>VIM</sub>* family in a GES-1 extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 474–475.
- PATON, R., MILES, R., HOOD, J. & AMYES, S., 1993. ARI-1: β-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2**: 81–88.
- PATZER, J., TOLEMAN, M., DESHPANDE, L., KAMINSKA, W., DZIERZANOWSKA, D., BENNETT, P., JONES, R. & WALSH, T., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla<sub>VIM-4</sub>* gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**: 451–456.
- PEIXE, L. M., 1996. Caracterização de β-lactamases plasmídicas de espectro ampliado em *E. coli*. Tese de Doutorado.
- PELEG, A., FRANKLIN, C., BELL, J. & SPELMAN, D., 2004. Emergence of IMP-4 metallo-β-lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 699–700.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- PITOUT, J. D., NORDMANN, P., LAUPLAND, K. B. & POIREL, L., 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 52–59.
- POIREL, L., COLLET, L. & NORDMANN, P., 2000a. Carbapenem-hydrolysing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerging Infectious Diseases* **6**: 84–85.
- POIREL, L., HÉRITIER, C., PODGLAJEN, I., SOUGAKOFF, W., GUTMANN, L. & NORDMANN, P., 2003. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV  $\beta$ -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 755–758.
- POIREL, L., LAMBERT, T., TÜRKÖGLÜ, S., RONCO, E., GAILLARD, J.-L. & NORDMANN, P., 2001a. Characterization of class I integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 546–552.
- POIREL, L., MAGALHÃES, M., LOPES, M. & NORDMANN, P., 2004. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>SPM-1</sub>-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1406–1409.
- POIREL, L., MARQUE, S., HERITIER, C., SEGONDS, C., CHAVANON, G. & NORDMANN, P., 2005. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 202–208.
- POIREL, L., NAAS, T., NICOLAS, D., COLLET, L., BELLAIS, S., CAVALLO, J.-D. & NORDMANN, P., 2000b. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 891–897.
- POIREL, L., WELDHANGEN, G., NAAS, T., CHAMPS, C. D., DOVE, M. & NORDMANN, P., 2001b. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas*

*aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2598–2603.

POURNARAS, S., MANIATI, M., PETINAKI, E., TZOUVELEKIS, L. S., TSAKRIS, A., LEGAKIS, N. J. & MANIATIS, A. N., 2003. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants *bla<sub>VIM-2</sub>* and *bla<sub>VIM-4</sub>*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 1409–1414.

POURNARAS, S., TSAKRIS, A., MANIATI, M., TZOUVELEKIS, L. S. & MANIATIS, A. N., 2002. Novel variant (*bla<sub>VIM-4</sub>*) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>VIM-1</sub>* in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 4026–4028.

PRATS, G., MIRO, E., MIRELIS, B., POIREL, L., BELLAIS, S. & NORDMANN, P., 2002. First isolation of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 932–933.

QUEENAN, A. M., TORRES-VIEIRA, C., GOLD, H. S., CARMELI, Y., ELIOPOULOS, G. M., MOELLERING, R. C., QUINN, J. P., HINDLER, J., MEDEIROS, A. A. & BUSH, K., 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 3035–3039.

QUINTEIRA, S., CARDOSO, O., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2003. Characterization of integrons carrying VIM-2 in *Pseudomonas* spp. from Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* **9** (Suppl 1): 55.

QUINTEIRA, S., FERREIRA, H. & PEIXE, L., 2005a. First isolation of *bla<sub>VIM-2</sub>* in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2140–2141.

QUINTEIRA, S., SOUSA, J. C. & PEIXE, L., 2005b. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- $\beta$ -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 451–453.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- RASMUSSEN, B. A. & BUSH, K., 1997. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(2): 223–232.
- RASMUSSEN, B. A., BUSH, K., KEENEY, D., YANG, Y., HARE, R., O'GARA, C. & MEDEIROS, A. A., 1996. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a classe A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 2080–2086.
- RICCIO, M., PALLECCHI, L., FONTANA, R. & ROSSOLINI, G., 2001. In70 of plasmid pAX22, a *bla<sub>VM-1</sub>*-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1249–1253.
- RICCIO, M. L., FRANCESCHINI, N., BOSCHI, L., CARAVELLI, B., CORNAGLIA, G., FONTANA, R., AMICOSANTE, G. & ROSSOLINI, G. M., 2000. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla<sub>MP</sub>* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1229–1235.
- ROBERT-DERNUET, S., 1995. *Antibiotiques et antibiogrammes*. Décarie Vigot, Paris.
- ROLINSON, G. N., 1998. Forty years of  $\beta$ -lactam research. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**: 589–603.
- ROMLING, U. & TUMMLER, B., 2000. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 464–465.
- ROWE-MAGNUS, D. & MAZEL, D., 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 565–569.
- ROY, P., 1999. Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiology Today* **26**: 168–170.

- SAAVEDRA, M., PEIXE, L., SOUSA, J. C., HENRIQUES, I., ALVES, A. & CORREIA, A., 2003. Sfh-1, a subclasse B2 metallo- $\beta$ -lactamase from *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 23–30.
- SABATH, L. & ABRAHAM, E., 1966. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochemical Journal* **98**: 11c–3c.
- SADER, H., CASTANHEIRA, M., MENDES, R., TOLEMAN, M., WALSH, T. & JONES, R., 2005a. Emerging epidemic of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances. *International Journal of Antimicrobial Agents* **25**: 57–61.
- SADER, H., REIS, A., SILBERT, S. & GALES, A., 2005b. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 73–76.
- SAINO, Y., KOBAYASHI, F., INOUE, M. & MITSUHASHI, S., 1982. Purification and properties of inducible penicillin  $\beta$ -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **22**: 564–570.
- SANDVANG, D., AERESTRUP, F. M. & JENSEN, L. B., 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 37–41.
- SARDELIC, S., PALLECCHI, L., PUNDA-POLIC, V. & ROSSOLINI, G., 2003. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Croatia. *Emerging Infectious Diseases* **9**: 1022–1023.
- SCHRECHENBERGER, P. C., DANESHVAR, M. I., WEYANT, R. S. & HOLLIS, D. G., 2003. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In *Manual of clinical microbiology* (Eds. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & R. H. Tenover), pp. 749–779, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- SCOULICA, E., NEONAKIS, I., GIKAS, A. & TSELENTIS, Y., 2004. Spread of *bla*<sub>VIM-1</sub>-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- of the integron carrying the *bla<sub>IM-1</sub>* metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **48**: 167–172.
- SEIFERT, H., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., PELZER, N., TJERNBERG, I. & VANECHOUTTE, M., 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2819–2825.
- SENDA, K., ARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OH-SUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA, M., 1996a. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909–2913.
- SENDA, K., ARAKAWA, Y., NAKASHIMA, K., ITO, H., ICHIYAMA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N. & OHTA, M., 1996b. Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 349–353.
- SHANNON, K., KING, A. & PHILLIPS, I., 1986.  $\beta$ -lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **17**: 45–50.
- SHIBATA, N., DOI, Y., YAMANE, K., YAGI, T., KUROKAWA, H., SHIBAYAMA, K., KATO, N., KAI, K. & ARAKAWA, K. Y., 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 5407–5413.
- SMITH, J. T. & LEWIN, C. S., 1993. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Veterinary Microbiology* **35**: 233–242.
- SORENSEN, A., DUCH, M., JORGENSEN, P. & PEDERSEN, F., 1993. Amplification and sequence analysis of DNA flanking integrated provirus by a single two-step polymerase chain reaction method. *Journal of Virology* **67**: 7118–7124.

- SOUSA, J. C., PEIXE, L. V., FERREIRA, H., PINTO, M. E., NASCIMENTO, M. S. J., SOUSA, M. I. & CABRAL, M., 1998. Antimicrobianos. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), vol. 1, pp. 239–269, Lisboa. Lidel.
- TALBOT, H. W., YAMAMOTO, D. K., SMITH, M. W. & SEIDLER, R. J., 1980. Antibiotic resistance and its transfer among clinical and nonclinical *Klebsiella* strains in botanical environments. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 97–104.
- TANKOVIC, J., LEGRAND, P., GATINES, G., CHEMINEAU, V., BRUN-BUISSON, C. & DUVAL, J., 1994. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 2677–2681.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D. & SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233–2239.
- THOMSON, K. S. & MOLAND, E. S., 2000. Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millenium. *Microbes & Infection* **2**: 1225–1235.
- TOLEMAN, M. A., A., M., SIMM, A. M., MURPHY, T. A., GALES, A. C., BIEDENBACH, D. J., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 673–679.
- TOLEMAN, M. A., BIEDENBACH, D., BENNETT, D., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2003. Genetic characterization of a novel metallo-b-lactamase gene, *bla<sub>IMP-13</sub>*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 583–590.
- TOLEMAN, M. A., BIEDENBACH, D., BENNETT, D., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2005. Italian metallo- $\beta$ -lactamases: a national problem? Report from

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 61–70.
- TOLEMAN, M. A., ROLSTON, K., JONES, R. N. & WALSH, T. R., 2004. *bla*<sub>VIM-7</sub>, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 329–332.
- TRIEU-CUOT, P. & POYART, C., 1998. Visite guidée au coeur de l'arsenal bactérien. *La Recherche* **314**: 62–66.
- TÓRTOLA, M., LAVILLA, S., MIRÓ, E., GONZÁLEZ, J., LARROSA, N., SABATÉ, M., NAVARRO, F. & PRATS, G., 2005. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 3492–3494.
- TSAKRIS, A., POURNARAS, S., WOODFORD, N., PALEPOU, M.-F. I., BABIBI, G. S., DOUBOYAS, J. & LIVERMORE, D. M., 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 329–332.
- TSAKRIS, A., TASSIOS, P., POLYDOROU, F., PAPA, A., MALAKA, E., ANTONIADIS, A. & LEGAKIS, N., 2003. Infrequent detection of acquired metallo- $\beta$ -lactamase among carbapenem-resistant *Pseudomonas* isolates in a Greek hospital. *Clinical Microbiology and Infection* **9**: 846–851.
- TYSALL, L., STOCKDALE, M. W., CHADWICK, P. R., PALEPOU, M. F., TOWNER, K. J., LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N., 2002. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 212–218.
- VASEN, W., DESMERY, P., ILUTOVICH, S. & MARTINO, A., 2000. Intrathecal use of colistin. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3523.
- VILANOVA, X., MANERO, A., CERDÀ-CUÉLLAR, M. & BLANCH, A. R., 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 279–288.

- WALSH, T., TOLEMAN, M., HRYNIEWIEZ, W., BENNETT, P. & JONES, R., 2003. Evolution of an integron carrying *bla*<sub>VIM-2</sub> in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 116–119.
- WALSH, T., TOLEMAN, M., POIREL, L. & NORDMANN, P., 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* **18**: 306–325.
- WATANABE, M., IYOBE, S., INOUE, M. & MITSUHASHI, S., 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**: 147–151.
- WOODFORD, N., TIerno, P. M., YOUNG, K., TYSALL, L., PALEPOU, M.-F., WARD, E., PAINTER, R., SUBER, D., SHUNGU, D., SILVER, L., INGLIMA, K., KORNBLUM, J. & LIVERMORE, D. M., 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4793–4799.
- YAN, J., KO, W., CHUANG, C. & WU, J., 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 503–511.
- YAN, J., KO, W., WU, S. T. H. & HU, J., 2001a. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*<sub>IMP-8</sub> in a university medical center in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 4433–4439.
- YAN, J. J., HSUEH, P.-R., KO, W.-C., LUH, K.-T., TSAI, S.-H., WU, H.-M. & WU, J.-J., 2001b. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2224–2228.
- YANG, Y., WU, P. & LIVERMORE, D. M., 1990. Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**: 755–758.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

---

- YANO, H., KUGA, A., OKAMOTO, R., KITASATO, H., KOBAYASHI, T. & INOUE, M., 2001. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1343–1348.
- YAO, J. D. C. & MOELLERING, R. C., 2003. Antibacterial agents. In *Manual of clinical microbiology* (Eds. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Tenover & R. H. Tenover), pp. 1039–1073, Washington D. C. American Society For Microbiology.
- YATSUYANAGI, J., SAITO, S., HARATA, S., SUSUKI, N., ITO, Y., AMANO, K. & ENOMOTO, K., 2004a. Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP-2</sub>* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 626–628.
- YATSUYANAGI, J., SAITO, S., ITO, Y., OHTA, K., KATO, J., HARATA, S., SUSUKI, N. & AMANO, K., 2004b. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harboring the *bla<sub>IMP-2</sub>* metallo- $\beta$ -lactamase gene in Akita Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* **57**: 130–132.
- YIGIT, H., QUEENAN, A. M., ANDERSON, G. J., DOMENECH-SANCHEZ, A., BIDDLE, J. W., STEWARD, C. D., ALBERTI, S., BUSH, K. & TENOVER, F. C., 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1151–1161.
- YIGIT, H., QUEENAN, A. M., RASHEED, J., BIDDLE, J. W., DOMENECH-SANCHEZ, A., ALBERTI, S., BUSH, K. & TENOVER, F. C., 2003. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 3881–3889.
- YOUNG, H. K., 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**: 627–635.

- YUM, J., YI, K., LEE, H., YONG, D., LEE, K., KIM, J., ROSSOLINI, G. & CHONG, Y., 2002a. Molecular characterization of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two novel integrons carrying *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassettes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 837–840.
- YUM, J., YONG, D., LEE, K., KIM, H.-S. & CHONG., Y., 2002b. A new integron carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **42**: 217–219.
- ZARRILLI, R., MARGHERITA, M., BAGATTINI, M., BARRETTA, E., POPOLO, A., TRIASSI, M. & VILLARI, P., 2004. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 946–953.
- ZHOU, X., KITZIS, M. & GUTMANN, L., 1993. Role of cephalosporinase in carbapenem resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**: 1387–1389.



Estadística de la salud de Gran Canaria: problemas de cartografía con impacto clínico  
Ana María Muñoz Jiménez

F.S.530 | Año: 2005 | 30 Ejemplares (1ª Edición) | Producción Gráfica: AJNet | [www.ajnet.net](http://www.ajnet.net)