RPDI
Setembro > Dezembro 2011 / Vol. 7 > N.º 3

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Carbapenemases em bactérias de Gram-negativo: o novo desafio terapêutico

Carbapenemases in Gram-negative bacteria: the new therapeutic challenge

/ G. Jorge da Silva[1] / A. Duarte[2]

[1] Centro de Estudos Farmacêuticos e Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra
[2] iMED, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

Correspondência:

Gabriela Jorge da Silva
Faculdade de Farmácia, Pólo das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra
Azinhaga de Sta Comba,
3000-548 Coimbra

Telefone: +351 239488460
e-mail: gjsilva@ci.uc.pt

/ Resumo

A emergência e a disseminação da resistência aos carbapenemos no mundo representam uma ameaça significativa no tratamento de infecções adquiridas no hospital. Desde o início de 2000, um número crescente de bactérias Gram-negativo resistentes aos carbapenemos tem sido encontrado, devido à produção de carbapenemases, que inactivam carbapenemos, e frequentemente, outros antibióticos ß-lactâmicos. Estas enzimas são expressas por genes que têm capacidade de transferência entre espécies bacterianas diferentes. São encontradas em três classes diferentes de ß-lactamases (classe A, B e D). Na classe A, a KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) encontra-se principalmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, alguns responsáveis por surtos hospitalares. As carbapenemases da classe B são metalo-ß-lactamases (MBL), incluindo a IMP-5 e VIM-2. As carbapenemases de classe D ou OXA-tipo são encontradas principalmente em *Acinetobacter baumannii*, (OXA-23, OXA-40, OXA-58), à excepção da OXA-48, que tem sido encontrada somente nas enterobactérias. Recentemente, tem sido dada muita atenção à metalo-ß--lactamase NDM-1, que constitui um exemplo da rápida transferência de genes para outras espécies bacterianas, e também do comportamento humano na disseminação da resistência aos antibióticos. A identificação de bactérias Gram--negativo produtoras de carbapenemases é essencial, e devem ser implementadas medidas estritas no controlo de infecção sempre que estas sejam detectadas.

Palavras-chave: Carbapenemos; Resistência aos antibacterianos; Epidemiologia; ß-lactamases.

/ Abstract

The emergence and dissemination of carbapenem resistance worldwide represents a significant threat for the management of hospital-acquired infections. Since 2000, we have witnessed an increase recovery of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria due to the production of carbapenemases, ß-lactamases that can inactivate carbapenems, and frequently, other ß-lactam antibiotics. These enzymes are expressed by genes that have the ability to spread between different bacterial species, and are found in three different

ß-lactamase classes (class A, B and D). The carbapenemase KPC is the emergent ß-lactamase in class A, mostly found in Klebsiella pneumoniae isolates, some responsible for several hospital outbreaks. Class B carbapenemases are metallo-ß-lactamases (MBL), including IMP-5 and VIM-2, which have the widest substrate spectrum. Class D OXA-type carbapenemases are found mainly in Acinetobacter baumannii (OXA-23, OXA-40, OXA-58), except for OXA-48, which has been found only in enterobacteria. Recently, main attention has been given to the NDM-1 metallo-ß-lactamase, due to its fast spread between species and geographic locations, which has highlighted the global consequences of human behavior on dissemination of antibiotic resistance. The identification of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria is crucial and more effective infection control measures should be implemented.

Key-words: *Carbapenems; Antimicrobial resistance; Epidemiology; ß-lactamases.*

/ Introdução

O mecanismo de resistência aos antibióticos ß-lactâmicos mais comum é a produção de enzimas denominadas de ß-lactamases, que hidrolisam o anel ß-lactâmico e inactivam a acção terapêutica do antibiótico. Estima-se que existam cerca de 600 ß-lactamases descritas, o que revela a enorme plasticidade bacteriana para se adaptar aos desafios impostos ao longo dos anos pela indústria farmacêutica. Os antibióticos ß-lactâmicos são classificados em quatro grandes grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactamos e carbapenemos. Os carbapenemos (imipenemo, meropenemo, ertapenemo e doripenemo) são compostos que apresentam um largo espectro de acção antibacteriana, estáveis à maioria das ß-lactamases, devendo ser considerados agentes antibacterianos de retaguarda. Contudo, após a introdução do imipenemo na terapêutica na década de oitenta, é descrita em 1990 a primeira carbapenemase em *Serratia marcescens*[1]. Desde então, têm sido encontradas em diferentes áreas geográficas, e principalmente, em bactérias de Gram--negativo. Este facto constitui uma enorme preocupação no tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, em que os carbapenemos são considerados como uma das poucas alternativas terapêuticas.

Neste contexto é importante que se conheça a epidemiologia das carbapenemases, quer pela identificação dos genes responsáveis pela sua expressão, quer pela capacidade que as bactérias têm de disseminar os genes entre si. Este artigo tem como objectivo principal dar uma visão global sobre a epidemiologia das carbapenemases mais frequentemente encontradas, dando ênfase às encontradas em Portugal, e às carbapenemases que podem vir a emergir rapidamente no nosso território, para os quais os clínicos e profissionais de laboratórios de Patologia Clínica devem ser alertados.

/ Classificação de carbapenemases e suas características

As carbapenemases são ß-lactamases que têm a capacidade de hidrolisar os carbapenemos. Em termos clínicos, esta é uma definição muito redutora. Nem todas as carbapenemases hidrolisam os carbapenemos de igual forma e/ou com a mesma eficiência (dependendo do tipo de carbapenemo e da enzima), o que se traduz em concentrações mínimas inibitórias (CMIs) com diferentes valores, situados abaixo ou acima dos valores limites entre o sensível e o resistente. Em bactérias resistentes aos carbapenemos com valores de CMI muito elevados podem eventualmente estar associados outros mecanismos de resistência, como diminuição da permeabilidade de membrana externa e/ou mecanismo de efluxo[2].

TABELA 1 – PRINCIPAIS CARBAPENEMASES SEGUNDO O LOCAL DE ACÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE AMBLER

Serina-ß-lactamases		Metalo-ß-lactamases
Classe A	**Classe D** (Oxacilinases)[a]	**Classe B** (MBLs)
• NMC-A • IMI-1 • SME-1 à SME-3 • GES-1 à GES-17 • KPC-1 à KPC-11	• OXA-23 • OXA-24 (inclui a OXA-40) • OXA-58 • OXA-48	• IMP-1 à IMP-30 • VIM-1 à VIM-30 • SPM-1 • NDM-1 à NDM-4

[a] principais grupos onde estão incluídas diferentes OXA, mas homólogas entre si

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS CARBAPENEMASES EM FUNÇÃO DO MICRORGANISMO

Microrganismo	Classe A (KPC)	Classe D (OXA)	Classe B (MBLs)
Klebsiella pneumoniae	++	++	+++
Escherichia coli	+/-	+	+/-
Outras Enterobactérias	+/-		+/- a +
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+++
Acinetobacter baumannii	+/-	+++	+

(Adaptado de referência 4)
+++ Elevada prevalência (> 10%)
++ Moderada prevalência (1 - 10%)
+ Baixa prevalência
+/- Casos isolados

Na classificação de Ambler as ß-lactamases estão distribuídas por quatro grupos de acordo com a sua sequência aminoacídica[3]. As carbapenemases estão incluídas em três delas: classe A ou penicilinases; a classe D ou oxacilinases e a classe B ou metalo--ß-lactamases (MBLs). As duas primeiras classes têm o aminoácido serina como centro activo, enquanto as MBLs têm o ião metal divalente Zn^{++} no centro activo da enzima. Na Tabela 1 apresenta-se esta classificação, mencionando os tipos de enzimas mais frequentemente descritos.

O perfil de susceptibilidade conferido pelas carbapenemases de classe A e D é diferente do conferido pelas MBLs. As primeiras apresentam geralmente baixa eficiência hidrolítica relativamente às MBLs, o que nem sempre se traduz em resistência clínica, a não ser que outros mecanismos de resistência estejam associados. A susceptibilidade aos inibidores dos ß-lactamases é variável. Em contraste, as MBLs podem hidrolisar TODOS os antibióticos ß-lactâmicos, excepto aztreonamo, e são resistentes aos inibidores de ß-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam).

/ Epidemiologia global

As primeiras carbapenemases descritas foram as metalo-ß-lactamases do tipo IMP e VIM, principalmente em bacilos Gram-negativo não fermentadores, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. As MBLs do tipo VIM estão muito associadas a *P. aeruginosa*, mas recentemente têm sido descritos numerosos surtos na Grécia em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de VIM-1, -2, -3 e -4 (Tabela 2), o que indicia uma endemecidade destas estirpes neste país[4,5]. Até à data, as MBLs têm sido reportadas em casos isolados, quer em *A. baumannii*, quer em enterobactérias, incluindo *Escherichia coli*. No entanto em *K. pneumoniae* e em *E. coli* têm emergido de uma forma extremamente preocupante as MBLs do tipo NDM (New-Delhi Metalo-ß-lactamase)[6,7]. A emergência a nível mundial destas enzimas, NDM-1 ou a sua variante NDM-2, constitui um enorme problema de saúde pública[8,9], porque praticamente todos os casos descritos têm relação com aéreas geográficas onde as estirpes produtoras destas enzimas são endémicas. A NDM-1, por exemplo, foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolada de um doente sueco que esteve hospitalizado na Índia[6]. Desde então, numerosos isolados, incluindo outras enterobactérias, e também em *A. baumannii*, têm sido descritos em todo o mundo[7,8,10,11,12]. A disseminação de bactérias produtoras desta enzima é definida como uma situação pandémica, para o que contribuem as viagens intercontinentais e o "turismo de saúde" realizado em países como a Índia e Paquistão[11]. Note-se que, estas bactérias além de inactivarem os antibióticos ß-lactâmicos, possuem na maioria das vezes resistência a outros grupos de antibióticos, como quinolonas e aminoglicosídeos, limitando de uma forma preocupante as opções terapêuticas. É de realçar que, a maioria das estirpes produtoras de NDM-1 apresenta uma 16rRNA metilase, que confere resistência a todos aminoglicosídeos[12].

Entre as carbapenemases, com o centro activo a serina, merecem destaque as da classe D ou oxacilinases, onde têm sido encontradas diversas variantes dos principais grupos OXA-51, OXA-24, OXA-48, OXA-58 principalmente em *A. baumannii*[13], e mais recentemente a OXA-143[14]. O facto do gene bla_{OXA-51} ser conservado nesta espécie tem sido proposto, como um marcador de identificação[15]. É de realçar que este microrganismo tem emergido como um importante patogéneo nosocomial oportunista devido em muito à sua multirresistência. Assim, em *A. baumannii* a resistência aos carbapenemos pode estar associada ao sinergismo entre vários mecanismos de resistência independentemente de expressarem uma ou várias oxacilinases[13]. Nas Enterobactérias, incluindo *E. coli*, as oxacilinases têm sido encontradas em casos isolados (Tabelas 2 e 3), embora a OXA-48 esteja disseminada por *K. pneumoniae* na Turquia, Médio Oriente e Norte de África[16,17,18]. No entanto, como se pode ver na Tabela 2 e 3, em *K. pneumoniae* é de salientar, que além das MBLs e as da classe D já referidas, são as carbapenemases da classe A que se têm destacado, nomeadamente as ß-lactamases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)[4,19].

A disseminação dos genes que codificam as carbapenemases pode ser por transmissão vertical entre a mesma espécie bacteriana, havendo

TABELA 3 – DISSEMINAÇÃO GLOBAL DE CARBAPENEMASES MAIS COMUNS

Tipo de enzima	Distribuição geográfica	Epidemiologia molecular
NDM (Nova Deli MBL)	Disseminada em Enterobactérias (*E. coli* e *K. pneumoniae*) Índia, Paquistão; Europa, América (casos importados)	Disseminação por plasmídeos entre estirpes e espécies
VIM	Distribuição global. Endémica na Grécia, sobretudo em *K. pneumoniae*.	Disseminação por plasmídeos
IMP	Distribuição global	Maioritariamente por disseminação por plasmídeos
KPC (Klebsiella pneumoniae)	USA desde 1999. Prevalente em Israel e Grécia. Vários surtos na Europa.	Plasmídeos em *K. pneumoniae*, por vezes a outras Enterobactérias. Disseminação clonal.
OXA-48	Disseminada em *K. pneumoniae* na Turquia, Médio Oriente e Norte de África	Plasmídeos e disseminação clonal

disseminação do clone, ou por transferência lateral dos determinantes genéticos localizados em elementos móveis, como plasmídeos, transposons e integrões, entre estirpes e espécies, e que tem um papel fundamental no aparecimento de surtos a nível mundial[20]. A metalo-ß-lactamase NDM pode ser dada como um exemplo. O facto do gene que codifica a NDM-1 estar localizado em plasmídeos conjugativos tem permitido a rápida transferência para outras espécies bacterianas. Note-se que, o conhecimento do contexto genético dos genes que codificam as carbapenemases é crucial para se compreender a sua epidemiologia. Na Tabela 3 apresenta-se a distribuição geográfica das carbapenemases frequentemente encontradas e microrganismos associados, referindo também os elementos genéticos móveis responsáveis pela disseminação.

/ Epidemiologia de carbapenemases em Portugal

É de todo o interesse conhecer quais as carbapenemases que já foram encontradas em Portugal e a sua distribuição geográfica. Este conhecimento permite ao patologista clínico estar sensibilizado para o aparecimento destas enzimas em certas espécies relativamente a outras.

As primeiras carbapenemases a serem encontradas no nosso país foram as MBLs, de acordo com a Tabela 4, IMP-5 em *A. baumannii*, *Acinetobacter* genoespécie 10 e *Pseudomonas aeruginosa*[21,22,23,24]. Os três isolados de *A. baumannii* foram identificados de culturas de urina e sangue, provenientes de doentes internados em diferentes serviços hospitalares (Medicina III Homens, Neurotraumatologia, Medicina Intensiva). Por métodos moleculares de tipificação verificou-se que eram geneticamente relacionados, mas diferentes das estirpes de *A. baumannii* incluídas no clone II Europeu, e que se tornaram epidémicas em Portugal. *Acinetobacter* genoespécie 10 foi isolada de uma amostra de sangue de um doente da Cirurgia, o que sugere que outras espécies menos comuns de *Acinetobacter* spp. poderão ser consideradas patogénicas. É de realçar que, a ß-lactamase IMP-5 foi encontrada em casos isolados, quer no tempo, quer no local, e apenas em Portugal. A IMP-8 foi encontrada em *Pseudomonas mendocina* num sanitário hospitalar[25], o que demonstra que microrganismos ambientais podem constituir um reservatório destas carbapenemases, e tornarem-se patogénios oportunistas em doentes imunodeprimidos. A VIM-2 foi descrita em *P. aeruginosa* em 2002[26], embora o isolado tenha sido identificado em 1995, tem sido encontrada em isolados de doentes com fibrose cística[27], e esporadicamente em isolados hospitalares sem qualquer relação clonal, em Vila Real[28] e em Lisboa[29,30]. Nestes isolados, a resistência ao imipenemo pode apresentar valores de CMI elevados, associados à ausência da porina OprD, específica no transporte deste antibiótico para o interior da célula[31]. Nas Enterobactérias a VIM-2 foi encontrada em três isolados de *Klebsiella oxytoca* num Hospital Pediátrico em Lisboa[32], os quais estavam circunscritos a uma unidade hospitalar e rapidamente foram tomadas medidas de modo a evitar a disseminação a outras unidades. Esta enzima VIM-2 foi encontrada num isolado de *Morganella morganii* identificado da urina de um doente do Hospital Universitário de Coimbra[33].

Não havendo dados oficiais, e tendo como base o que está publicado, os isolados produtores de MBLs têm sido identificados como casos esporádicos, o mesmo não se poderá dizer das carbapenemases que se inserem nos grupos D e A.

As carbapenemases de classe D (oxacilinases) são predominantes em isolados clínicos de *A. baumannii*, principalmente a OXA-40, que foi também encontrada na espécie *A. haemolyticus*[34,35]. Esta carbapenemase está associada a um clone multirresistente de *A. baumannii* endémico em vários hospitais portugueses há já vários anos, e também em Espanha, pelo que foi designado de clone Ibérico[35,36]. Este clone é um sub-linhagem do clone Europeu II[36], que apresenta o grupo clonal ST98[37] (ST, *sequence typing*) e está disseminado no mundo. A importância geográfica assume aqui alguma relevância, e mais uma vez a determinação do grupo clonal ST permite acompanhar temporal e localmente a disseminação

TABELA 4 – EPIDEMIOLOGIA DE CARBAPENEMASES EM PORTUGAL

Classe B MBLs	Microrganismo	Local e data	Referência
IMP-5	*Acinetobacter baumannii*	Hospitais da Universidade de Coimbra, 1998	21
	Pseudomonas aeruginosa	Hospitais: Setúbal, Lisboa (Santa Maria, D.ª Estefânia); 2001, 2002, 2003	23,24
IMP-8	*Pseudomonas mendocina*	Hospital Infante D. Pedro, Aveiro; 2005	25
VIM-2	*Pseudomonas aeruginosa*	Hospital, 1995; 2005; 2006 Ambulatório 1998	26,27,28,29
	Klebsiella oxytoca	Hospital D.ª Estefânia, Lisboa; 2004	32
	Morganella morgannii	Hospitais da Universidade de Coimbra, 2004	33
Classe D	**Microrganismo**	**Local e data**	**Referência**
OXA-40	*Acinetobacter baumannii*	Diversos hospitais do Norte, Centro e região de Lisboa; desde 1999- Sub-grupo do Clone Europeu II, Clone Ibérico	34,35,36,37
	Acinetobacter haemolyticus	Hospital Geral de Sto António, Porto, 2002	34
OXA-58	*Acinetobacter baumannii*	Hospital Santo António dos Capuchos, Lisboa; 2005	39
OXA-23	*Acinetobacter baumannii*	Hospitais do Norte e Centro, 2006-2008 Hospital do Espírito Santo de Évora; 2008, Clone NI	38 NP
Classe A	**Microrganismo**	**Local e data**	**Referência**
KPC 3	*Klebsiella pneumoniae*	Centro Hospitalar Lisboa Norte, 2009	40

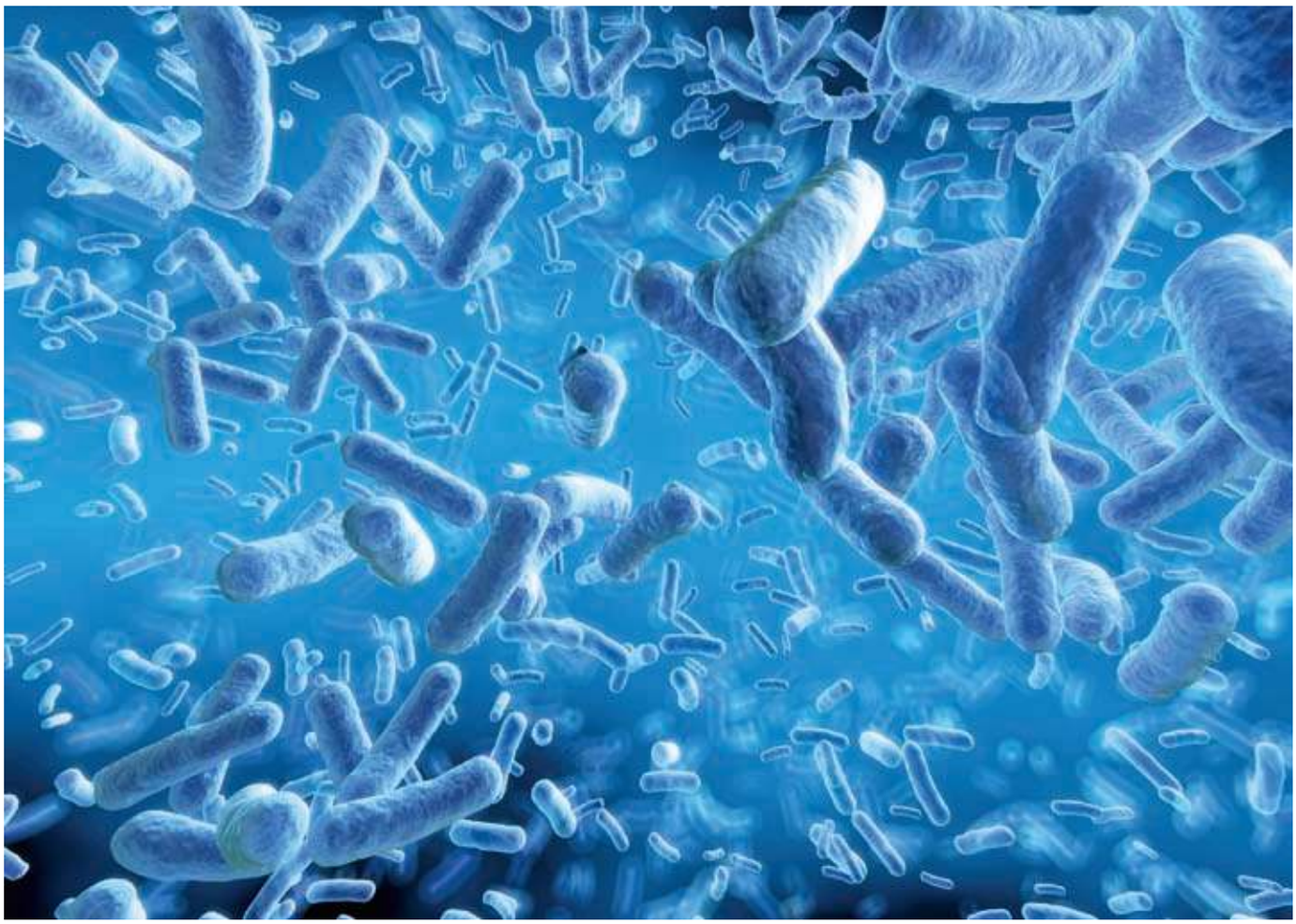
NI – não identificado; NP, não publicado

de bactérias multirresistentes. Tal como acontece mundialmente, também em Portugal têm sido descritas as outras variantes dos principais grupos destas carbapenemases, nomeadamente a OXA-23 associada ao clone ST103[38] no Norte e Centro, e em Évora no Hospital de Espírito Santo, entre 2008 e 2009 (não publicado), embora tenha sido identificado neste hospital maioritariamente o clone ST98 produtor de OXA-40, enquanto em Lisboa na mesma altura foi identificada a OXA-58, também num isolado hospitalar[39]. Nestes isolados a resistência aos carbapenemos está normalmente associada a diferentes mecanismos, em particular a co-existência de oxacilinases com expressão de bombas de efluxo e/ou com alteração de porinas da membrana externa é frequente[31].

Relativamente às carbapenemases de classe A, a KPC-3 foi a primeira enzima encontrada em Portugal, em 2009, num isolado de *K. pneumoniae* proveniente de um doente com leucemia internado no Centro Hospitalar Lisboa Norte. A estirpe apresentava resistência às principais classes de antibióticos disponíveis em clínica, e pertencia ao grupo clonal ST11[40]. O facto do gene bla_{KPC-3} estar num transposão, integrado num plasmídeo conjugativo, facilita a sua disseminação entre géneros diferentes como *E. coli*, *Enterobacter* spp. e, inclusivamente entre estirpes de *K. pneumoniae* de grupos clonais diferentes, o que permite a permanência destas bactérias multiresistentes nas unidades de cuidados de saúde.

/ Impacto clínico e económico

A infecção por uma bactéria produtora de carbapenemase é um verdadeiro desafio terapêutico para o clínico. As MBLs apresentam um espectro de hidrólise alargado a praticamente todos os antibióticos ß-lactâmicos. As carbapenemases dos grupos A e D, embora não sendo tão eficientes, aparecerem vulgarmente em bacilos Gram-negativo não fermentadores, geralmente resistentes a muitos outros grupos de antibióticos. O aparecimento recente de MBLs e KPC em enterobactérias e a sua rápida disseminação constitui um cenário preocupante. Vivemos uma época em que muitos microrganismos de origem clínica são multirresistentes, incluindo enterobactérias, diminuindo as opções terapêuticas drasticamente. A



resistência aos antibióticos prolonga o tempo de infecção, aumenta o sofrimento do doente, em muitos casos, acrescido com maior risco de mortalidade. Antibióticos como as polimixinas, que raramente eram usados devido à sua toxicidade, são um dos últimos recursos terapêuticos. O impacto económico da resistência bacteriana não é de descurar. Acresce o aumento do tempo de hospitalização, dos testes laboratoriais e o recurso a terapêuticas mais dispendiosas. Nos últimos anos têm surgido novos compostos para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivo, o que não acontece com as bactérias Gram-negativo, e infelizmente, os indicadores apontam para uma investigação mais vocacionada para as doenças crónicas e degenerativas, as quais são opções mais vantajosas para os laboratórios farmacêuticos. Portanto, a identificação de estirpes produtoras de carbapenemases e o controlo da sua disseminação é, assim, essencial para melhorar os cuidados de saúde, na medida que o conhecimento atempado de pacientes com infecções por bactérias multiressistentes é crucial e o laboratório de Microbiologia tem um papel essencial na detecção e identificação destas estirpes. Contudo, a identificação precisa da carbapenemase só pode ser feita por métodos moleculares, metodologia a que muitos laboratórios não têm acesso no nosso país. Os laboratórios hospitalares de Bacteriologia e os de Universidades e/ou de Centros de Investigação deveriam associar-se formalmente, sob coordenação das entidades oficiais, criando sinergias no sentido de melhorar a prevenção e o controlo de estirpes resistentes e na generalidade, melhorar a saúde pública em Portugal.

/ Conclusão

O aparecimento de carbapenemases, especialmente em Enterobactérias multirresistentes, expressando outras ß-lactamases e/ou com outros mecanismos de resistência, tem vindo a aumentar mundialmente a uma rapidez alarmante. A rapidez da disseminação tem estimulado a comunidade científica a compreender as bases genéticas para este acontecimento. Contudo, ainda não existe informação adequada para lidar com este problema a nível clínico, e encontrar alternativas terapêuticas. Daí que, um sinergismo entre o laboratório clínico microbiológico e estudos clínicos, em que se comparem sintomas clínicos, evolução da infecção, tipo de microrganismo e enzima envolvidos, seja frutuoso no sentido de se poder eventualmente estabelecer terapêuticas mais eficazes e, essencialmente, de se implementar medidas estritas do controlo de infecção sempre que se detectar carbapenemases.

/ Bibliografia

1. Yang Y, Wu P, Livermore DM. Biochemical characterization of a ß-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenemos from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 755-758.

2. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 2010; 300: 371-379.

3. Ambler RP. The structure of ß-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980*;* 289*:* 321–331.

4. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010; 36 Suppl 3: S8-14.

5. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-ß-lactamases: a last frontier for ß-lactams? Lancet Infect Dis 2011; 11: 381-393.

6. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo-ß--lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 5046–5054.

7. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. Euro Surveill 2010;18;15(46). pii: 19716

8. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. J Antimicrob Chemother. 2011; 66:1260-1262.

9. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? J Antimicrob Chemother 2011; 66: 689-692.

10. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother 2011; 66 :1255-1259.

11. Chan HL, Poon LM, Chan SG, Teo JW. The perils of medical tourism: NDM-1-positive *Escherichia coli* causing febrile neutropenia in a medical tourist. Singapore Med J. 2011; 52: 299-302.

12. Bogaerts P, Bouchahrouf W, de Castro RR, Deplano A, Berhin C, Piérard D, Denis O, Glupczynski Y. Emergence of NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55 :3036-3038.

13. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826-836.

14. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 5035-5038.

15. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the $bla_{OXA-51-like}$ carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 2006; 44: 2974-2976.

16. Levast M, Poirel L, Carrër A, Deiber M, Decroisette E, Mallaval FO, Lecomte C, Nordmann P. Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 944-945.

17. Ktari S, Mnif B, Louati F, Rekik S, Mezghani S, Mahjoubi F, Hammami A. Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 {beta}-lactamase in a Tunisian university hospital. J Antimicrob Chemother. 2011; 11. doi: 10.1093/jac/dkr181

18. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT, Araj GF, Matar GM. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. Ann Trop Med Parasitol. 2010; 104: 327-330.

19. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase bla_{KPC-2} gene. Emerg Infect Dis. 2010;16: 1349-1356.

20. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, et al. Dissemination of bla_{KPC-2} by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2011; doi:10.1128/AAC.01783-10

21. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R, Peixe L, Duarte A. Molecular characterization of bla_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-beta--lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol Lett. 2002; 215: 33-39.

22. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Peixe L, Duarte A. First appearance of a bla_{IMP} gene in an *Acinetobacter* genospecies 10 clinical strain associated with reduced susceptibility to imipenem. *In* Abstract book of 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Slovenia.

23. Brízio A, Grosso F, Conceição T, Da Silva G, Duarte A. IMP-5, metalo-ß-lactamase, em estirpes hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Port D Infecc 2006; 2: 20-30.

24. Brízio A, Conceição T, Pimentel M, Da Silva G, Duarte A. High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 2006; 27: 27-31.

25. Santos C, Caetano T, Ferreira S, Mendo S. First description of bla_{IMP-8} in a *Pseudomonas mendocina* isolated at the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal. Res Microbiol. 2010; 16: 305-307.

26. Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. Metallo-beta--lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. Microb Drug Resist. 2002; 8: 93-7.

27. Cardoso O, Alves AF, Leitão R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31: 375-379.

28. Carvalho MJ,. Saavedra MJ, Correia A, A.P. Castro, A. Duarte. Metallo-beta-lactamase in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate in a Portuguese hospital and identification of a new VIM-2 like enzyme. Clin Microbiol Infect. 2005; 11, Supl 2: 99.

29. Brizio A, Silva A, Canas E, Ferreira T, Lito LM, Melo-Cristino J, Salgado MJ, Duarte A. Spread of In58 containing bla_{VIM-2} among *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2006; 12, 4: 931.

30. Grosso F, Duarte A. Emergência da Resistência aos Carbapenemos. Rev Port D Infecc, 2006; 2: 13-19.

31. Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 2219-2224.

32. Conceição T, Brízio A, Duarte A, Barros R. First isolation of bla_{VIM-2} in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 476.

33. Da Silva GJ, Cardoso O, Domingues S, Bento G, Ribeiro G. First report of a *Morganella morganii* clinical isolate producing VIM-2 carbapenemase. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: Supl. 7: S237-38

34. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem--resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 3465-3466.

35. Da Silva GJ, Quinteira S, Bértolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L; Portugese Resistance Study Group. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. J Antimicrob Chemother. 2004; 54: 255-258.

36. Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A. Identification of widespread closely related *Acinetobacter baumannii* strains in Portugal as a subgroup of European clone II. Clin Microbiol Inf. 2007; 13: 190-195

37. Da Silva GJ., Mendonça N, Batista G, Duarte A. Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 2254-2256.

38. Grosso F, Quinteira S, Peixe L. Understanding the dynamics of imipenem--resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1275-1279.

39. Caneiras C, Ferreira T, Duarte A, Da Silva G. Identification of an OXA-58 carbapenemase in an unusual Portuguese *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14, supl 7: S43.

40. Machado P, Silva A, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST11-producing KPC-3 carbapenemase at a Lisbon hospital. Clin Microbiol Infec, 2010; 16, Supl 2: S28.