

# Microbiological characterization of plasmid-mediated AmpC $\beta$ -lactamases and *E. coli* hyperproducers: how and why ?

Annibale Raglio<sup>1</sup>, Marco Arosio<sup>1</sup>, Paola Stano<sup>2</sup>, Angela Acerbis<sup>1</sup>, Francesca Vailati<sup>1</sup>, Marco Passera<sup>1</sup>, Annalisa Grigis<sup>1</sup>, Antonio Goglio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> U.S.C. Microbiologia e Virologia, A.O. Ospedali Riuniti in Bergamo;

<sup>2</sup> S.C. Microbiologia e Virologia, AO Santa Maria degli Angeli, Pordenone.

**Key-words:** AmpC, phenotypic test, *E. coli* hyperproducer, sequencing.

**Caratterizzazione microbiologica delle  $\beta$ -lattamasi AmpC plasmide-mediate e *E. coli* iperproduttori: come e perché**

## SUMMARY

The aim of this study is the evaluation of phenotypic method for the detection of plasmid-mediated AmpC producing *Enterobacteriaceae* by agar diffusion. We developed a phenotypic method with double disk test (CLSI) and evaluation of synergism between Cloxacillin and/or Boronic Acid with cefotaxime and ceftazidime and cefepime with amoxicillin/clavulanic acid. As reference method for AmpC detection we used a multiplex PCR according to Perez-Perez.

Among 7476 *Enterobacteriaceae* we detected 45 strains: 37 (82.2%) plasmid-mediated AmpC producers, 6 (13.3%) *E. coli* hyperproducers and 2 *E. coli* (4.5%) positive for both. The AmpC phenotypic test was positive for all the isolates, showing a typical ghost zone between cloxacillin and cephalosporins or boronic acid and cephalosporins. The AmpC multiplex PCR confirmed that 28 *P. mirabilis* and 7 *E. coli* harboured a gene belonging to the bla-CMY-LAT family. Sequencing defined the presence of CMY-16 in all *P. mirabilis*, CMY-2 in *E. coli*, DHA-1 in 3 *K. pneumoniae* and FOX in 1 *K. pneumoniae* and allowed us to identify eight strains as *E. coli* hyperproducer: six *E. coli* yielded no amplicon and 2 were also producer of CMY-2. In this study the phenotypic method showed a sensitivity and a specificity of 100%. Waiting for the indication of international authorities, we think this phenotypic screening method could be useful in the routine of microbiological laboratories.

## INTRODUZIONE

Le  $\beta$ -lattamasi AmpC, classificate secondo Ambler nella classe C e nel gruppo 1 in quella di Bush-Jacoby-Medeiros, sono enzimi ben definiti e con una larga specificità di substrato (1).

Questi enzimi, entrambi cromosomali e plasmide mediati, mostrano uno spettro di azione simile alle  $\beta$ -lattamasi ESBL ma non sono di solito attive o molto poco attive sulle cefalosporine di quarta generazione (come cefpirone e cefepime) e aztreonam.

Le  $\beta$ -lattamasi AmpC plasmide-mediate sono prodotte da un trasferimento del gene cromosomiale, per mezzo di un plasmide, da differenti *Enterobacteriaceae* e sono più frequentemente trovate in *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (1, 6-8).

Tra le AmpC anche gli *E. coli* iperproduttori sono ben caratterizzati ma la loro rilevazione risulta ancora difficoltosa con le tradizionali tecniche (4).

Attualmente nessun consenso internazionale è approvato per la rilevazione delle AmpC. Queste  $\beta$ -lattamasi prodotte dalle *Enterobacteriaceae* potrebbero essere solo sospettate secondo il test di screening per ESBL del CLSI (ridotto diametro o aumento della MIC pur rimanendo nel range di sensibilità), però non presentano un incremento della sensibilità alle cefalosporine di terza generazione associate al clavulanato nel test di conferma (doppio-disco) (8).

Alcuni autori usano la cefoxitina come possibile marker per gli enzimi AmpC ma la resistenza alla cefoxitina è soltanto suggestiva di una  $\beta$ -lattamasi AmpC perché può avere altre cause (7, 19).

Negli ultimi anni, diversi test di laboratorio sono stati descritti per la rilevazione delle AmpC: test a tre dimensioni, cefoxitina-agar, inibitori  $\beta$ - e non- $\beta$ -lattamici e metodi molecolari (7). Recentemente, è stato proposto un test per le  $\beta$ -lattamasi AmpC che rileva il sinergismo tra i dischetti di ceftazidime e cefotaxime con acido boronico e cloxacillina (15, 19).

Questo test fenotipico non permette la completa differenziazione delle diverse famiglie di AmpC plasmide-mediate.

Il metodo gold standard per la conferma delle  $\beta$ -lattamasi AmpC è una PCR multiplex che utilizza primer specifici per

ogni famiglia (16).

Noi pensiamo che la validazione di un metodo fenotipico semplice e poco costoso potrebbe essere utile per la routine di laboratorio.

## MATERIALI E METODI

### Isolati batterici.

Abbiamo studiato tutti i ceppi di *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* isolati nel laboratorio di Microbiologia di Bergamo, nel periodo luglio 2007 – dicembre 2008 che erano risultati positivi ai criteri CLSI per lo screening delle ESBL, usando sia il metodo di disco diffusione sia quello automatizzato (breakpoint MIC, VITEK 2, bioMérieux).

Abbiamo anche recuperato dalla ceppoteca gli isolati di *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* con ridotta sensibilità alla cefoxitina ed alle cefalosporine di terza generazione ma non al cefepime, stoccati nel periodo gennaio 2005 - giugno 2007. Per l'identificazione di specie sono state utilizzate la card GN VITEK 2 (bioMérieux) e/o la galleria API 20 E (bioMérieux).

### Saggi di sensibilità agli antibiotici

In accordo alle indicazioni CLSI l'antibiogramma è stato eseguito con il metodo Kirby-Bauer (dischetti della Becton-Dickinson) e/o VITEK 2 includendo le seguenti molecole: cefoxitina, piperacillina/tazobactam, ceftriaxone, gentamicina, cotrimossazolo, ciprofloxacina, amikacina, ceftazidime, imipenem, cefepime.

### Test fenotipici

Il test fenotipico è effettuato posizionando su una piastra quadrata di 120 mm di lato un dischetto di ceftazidime, cefotaxime, e cefoxitina alla distanza di 20 mm (da centro a centro) da un dischetto di cloxacillina e ceftazidime/clavulanato, ceftazidime, cefotaxime e cefotaxime/clavulanato da un dischetto di acido boronico. Inoltre sono stati posti un dischetto di cefepime a 20 mm da un disco di cefepime/clavulanato (Figura 1).

Il diametro dei dischetti di acido boronico e cloxacillina (ROSCO) presentano un diametro di 10 mm a differenza

## Corresponding author: Annibale Raglio

USC Microbiologia e Virologia - Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti di Bergamo"

24128 Bergamo Italia, Largo Barozzi, 1 - Tel: 035-269012 - Fax: 035-266666

E-mai: araglio@ospedaliuniti.bergamo.it

degli altri (Becton-Dickinson) con un diametro di 6 mm. Il test fenotipico così ideato è stato usato anche per la rilevazione delle ESBL e per il sospetto di carbapenemasi.

La produzione di ESBL viene rilevata da un incremento della zona di inibizione  $\geq 5$  mm per ceftazidime/clavulanato o cefotaxime/clavulanato o cefepime/clavulanato confrontato col le stesse molecole senza inibitore, in accordo con le raccomandazioni CLSI (Figura II). In particolare l'utilizzo di cefepime e cefepime/clavulanato si dimostra utile per rilevare la presenza di ESBL in ceppi produttori anche di AmpC plasmide-mediato (Figura V) (15).

Dove i ceppi mostrano un sinergismo tra cloxacillina con ceftazidime e/o cefotaxime, e/o tra acido boronico con ceftazidime e/o cefotaxime e/o ceftazidime/clavulanato e/o cefotaxime/clavulanato sono stati riportati come sospetti produttori di AmpC plasmide-mediati (Figura III).

Nella stessa piastra sono stati posizionati anche una striscia in E-test di imipenem per la rilevazione di valori di MIC 2-4 poichè insieme al diametro del dischetto di ertapenem, rilevato nell'antibiogramma di routine (diametro 19-21 mm - CLSI), potrebbe indurre al sospetto di carbapenemasi e un dischetto di tobramicina per rilevare ceppi produttori di ESBL resistenti anche agli aminoglicosidi (Figura I).

### Analisi molecolare

Per la rilevazione di  $\beta$ -lattamasi AmpC plasmide-mediate abbiamo utilizzato la PCR multiplex secondo Perez-Perez (16). Si è proceduto all'estrazione del DNA batterico con un sistema di estrazione semi-automatizzato (Easy-Mag, bioMérieux) in accordo alle istruzioni del produttore.

I ceppi, confermati fenotipicamente, sono stati analizzati con una multiplex PCR per identificare ciascuna famiglia di AmpC: ACC, CMY-MOX, DHA-MOR, CMY-LAT e ACT-MIR confermate poi dal sequenziamento (ABI Prism 3130, Applied Biosystem).

Per l'amplificazione della regione promoter AmpC cromosomiale di *E. coli* sono stati usati primer e condizioni già descritte in precedenza ed i prodotti di PCR sono stati poi sequenziati per riconoscere eventuali mutazioni ed inserzioni (4).

### Analisi di sequenza

I dati ottenuti sono stati analizzati con il Sequencing Analysis software v 5.2 (Applied Biosystems). Le sequenze di entrambe le direzioni sono state allineate con NCBI BLAST 2 Sequence ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)). La sequenza consensus ottenuta è stata allineata con le sequenze di GenBank (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tutti i primer utilizzati nello studio sono elencati nella Tabella 1.

### Ceppi di controllo

La performance del test fenotipico è stata valutata con 13 isolati di differenti tipi di ESBL e CBL: 8 ceppi di *P. mirabilis* (7 CMY-16, TEM-52), 2 di *E. coli* (1 CTX-M-2, 1 AmpC iperproduttore), 2 di *K. pneumoniae* (1 SHV-12, 1 SHV-18), 1 di *K. oxytoca* (SHV-12).

Questi ceppi, gentilmente donati dalla Prof.ssa Pagani, erano stati precedentemente caratterizzati presso il Dipartimento di Scienze Morfologiche e Cliniche Microbiologia dell'Università di Pavia e sono stati esaminati in cieco con il nostro test fenotipico (17).

Per rilevare inoltre eventuali falsi negativi per la produzione di AmpC plasmide-mediati sono stati testati con la PCR multiplex, (risultata sempre negativa) 20 ceppi di *E. coli*, 5 ceppi di *K. pneumoniae* e 5 ceppi di *P. mirabilis* che sono stati classificati con il test fenotipico come ESBL produttori in accordo ai criteri CLSI.

### RISULTATI

I risultati del test fenotipico sono stati interpretati da 5 differenti operatori. Tutti gli isolati sono stati classificati correttamente dal metodo fenotipico.

Abbiamo esaminato un totale di 7476 ceppi di *Enterobacteriaceae* con 486 ceppi produttori di ESBL in accordo al test di conferma CLSI e 45 ceppi (10 collezionati tra gennaio 2005 e giugno 2007 e 35 isolati dalla routine di laboratorio durante il periodo luglio 2007 - dicembre 2008) furono classificati: 37 (82.2%) AmpC produttori plasmide mediati, 6 (13.3%) *E. coli* iperproduttori e 2 *E. coli* (4.5%) positivi per entrambi; sono stati identificati: 28 (62.2%) ceppi di *P. mirabilis*, 13 (28.9%) di *E. coli* e 4 (8.9%) *K. pneumoniae*.

I materiali sono stati ottenuti dal tratto urinario (16, 35.5%), dal sangue (12, 26.7%), pus (10, 22.2%) ed altri materiali (7, 15.6%); gli isolati nosocomiali sono stati 34 (75.4%), così distribuiti: 20 nelle Medecine, 13 nelle Chirurgie, 1 (2.2%) in Terapia Intensiva e 11 (24.4%) invece comunitari.

Tutti i ceppi mostravano resistenza alla cefoxitina, con l'eccezione di un *E. coli* iperproduttore, con resistenza o ridotta sensibilità al ceftazidime (MIC >256 - 3  $\mu$ g/ml), ed al ceftriaxone (MIC >256 - 2  $\mu$ g/ml).

Solo due ceppi hanno mostrato resistenza all'cefotaxina ma il test fenotipico e molecolare è risultato negativo (dati non mostrati) confermando che ci sono rari casi nei quali lo screening con la cefoxitina fallisce la rilevazione delle  $\beta$ -lattamasi AmpC.

Tutti gli isolati, eccetto quelli positivi per AmpC e ESBL, sono risultati sensibili *in vitro* al cefepime, una cefalosporina di quarta generazione, e mostrano una MIC tra 0.19 - 4  $\mu$ g/ml. Tutti gli isolati sono risultati sensibili anche all'imipenem con MIC 0.19 - 0.75  $\mu$ g/ml e all'ertapenem con diametro maggiore di 21 mm.

Il test fenotipico è risultato positivo per tutti gli isolati AmpC, mostrando sinergismo tra cloxacillina e cefalosporine o acido boronico e cefalosporine (con e senza clavulanato).

Tutti i ceppi sono stati scrinati con la PCR multiplex. 28 ceppi *P. mirabilis* e 7 di *E. coli* sono stati classificati nella famiglia *bla*-CMY-LAT.

La sequenza del gene ha confermato la presenza in tutti i ceppi di *P. mirabilis* di un nuovo sottotipo CMY-LAT, recentemente descritto e denominato CMY-16 e la presenza di un CMY-2 in isolati di *E. coli* (2, 5, 12) (Figura III, IX).

Un nuovo amplicone di 405 bp, che corrisponde alla famiglia *bla*-DHA, derivato dal gene AmpC cromosomiale di *M. morgani*, è stato rilevato in 3 isolati di *K. pneumoniae*: la sequenza del gene ha rilevato la presenza di una variante DHA-1 in tutti i ceppi associati al suo gene regolatorio AmpR (Figura IV).

Un altro gene plasmidico AmpC, appartenente alla famiglia *bla*-FOX, è stato trovato in un isolato di *K. pneumoniae* (11). Tutti i ceppi classificati come produttori di AmpC plasmide-mediato non mostravano un sinergismo al doppio-disco per ESBL con l'eccezione di 5 (11.1%) isolati che risultavano anche ESBL positivi: 2 di *E. coli* CMY-2 + CTX, 1 di *E. coli* iperproduttore + CTX e 2 di *K. pneumoniae* DHA-1 + SHV (Figura V - VI) (13, 14).

Sei ceppi di *E. coli* non presentavano nessun amplicone e sono stati quindi sottoposti ad ulteriori accertamenti molecolari. Un'analisi di sequenza della regione promoter AmpC è stata effettuata in questi isolati e confrontata con la stessa regione del ceppo wild type di *E. coli* (Figura VII).

L'analisi di sequenza ha rivelato la presenza di mutazioni nucleotidiche multiple nella regione di questi 6 ceppi. Questo risultato ha permesso di identificarli come ceppi di *E. coli* iperproduttori. Le mutazioni nella regione promoter sono state trovate anche in 2 ceppi di *E. coli* che presentavano il gene CMY-2, suggerendo la produzione di 2 differenti  $\beta$ -lattamasi AmpC nello stesso ceppo (Figura VIII).

Si sottolinea che il test fenotipico da noi proposto non permette l'identificazione delle diverse famiglie AmpC e la discriminazione tra ceppi di *E. coli* AmpC iperproduttori e/o plasmide mediati.

### DISCUSSIONE

I geni AmpC plasmide-mediati sono conosciuti dal 1989. Sono stati ritrovati in tutto il mondo sia da campioni nosoco-

**Tabella 1.** Primers usati in questo studio.

| Target(s)            | Sequenza (5' - 3')  | Referenze                        |
|----------------------|---|----------------------------------|
| Bla <sub>CMY</sub>   | F-GGGCCCCGGACACCYTTTTTGC<br>R-TAAGTGATAGTGACARCAGG              | Marco M. D'Andrea et al. (2)     |
| Bla <sub>DHA-1</sub> | F-ACACTGATTTCCGCTCTGCT  | C. Roche et al. (5)              |
| Multiplex Ampc       |   |                                  |
| MOX                  | F-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT<br>R-CACATTGACATAGGTGTGGTG              | F. Javier Peréz-Peréz et al. (8) |
| CMY-LAT              | F-TGGCCAGAAGTACAGGCAAA<br>R-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC               |                                  |
| DHA -1, DHA-2        | F-AACTTTTACAGGTGTGCTGGGT<br>R-CCGTACGCATACTGGCTTTTGC            |                                  |
| ACC                  | F-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA<br>R-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC              |                                  |
| ACT-1 MIR-IT         | F-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG<br>R-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT              |                                  |
| FOX-1 to FOX-5b A    | F-AACATGGGGTATCAGGGAGATG<br>R-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG             |                                  |
| Ampc Promoter        | F-GATCGTTCTGCCGCTGTG<br>R-GGGCAGCAAATGTGGAGCAA                  | S. Corvec et al. (10)            |
| Multiplex ESBL       |   |                                  |
| SHV                  | F-ATGCGTTATATTCGCTGTG<br>R-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA                 | H-J. Monstein et al. (15)        |
| TEM                  | F-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA<br>R-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT      |                                  |
| CTX                  | F-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC<br>R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG |                                  |

miali che comunitari, specialmente in *Enterobacteriaceae* che possono produrre anche ESBL. I report epidemiologici non mostrano un'alta prevalenza di ceppi produttori AmpC rispetto a quelli con ESBL.

Poiché questi ceppi stanno circolando anche nel nostro ospedale, abbiamo deciso di esaminare gli isolati clinici di *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* con AmpC plasmide-mediati e *E. coli* iperproduttori nel periodo 2005 – 2008 con un test fenotipico home-made modificato, una PCR multiplex ed il sequenziamento.

Attualmente CLSI ed EUCAST non propongono linee guida su come processare questi isolati. Alcuni autori hanno proposto di riportare senza modifiche i risultati dei test di chemio-sensibilità alle cefalosporine di terza e quarta generazione, non cambiando il risultato da sensibile a resistente, come raccomandato da CLSI per i ceppi produttori di ESBL (6).

I microrganismi che producono gli enzimi plasmide-mediati di classe C risultano negativi al test di conferma per le ESBL, secondo CLSI, e quindi per la loro rilevazione non si può utilizzare questo metodo.

Negli ultimi anni i microbiologi hanno mostrato un crescente interesse nel cercare nuovi metodi fenotipici per la rilevazione delle  $\beta$ -lattamasi AmpC nei batteri.

La resistenza alla cefoxitina è stata proposta come marker per lo screening delle AmpC ma non risulta un criterio sufficiente infatti, i microrganismi con il gene della famiglia ACC, risultano sensibili a questa molecola (3).

Siamo convinti che la mancata rilevazione degli isolati produttori di AmpC possa portare ad un fallimento terapeutico specialmente in corso di gravi infezioni.

Esistono già pubblicazioni di autori italiani su *P. mirabilis* CMY-16 responsabile di numerosi episodi infettivi nel Nord Italia. Questo studio conferma la presenza di questo ceppo anche a Bergamo ma anche di isolamenti sporadici *K. pneumoniae* DHA e FOX, *E. coli* CMY-2 ed *E. coli* iperproduttori tra i nostri isolati clinici.

Questi risultati confermano l'utilità di cloxacillina e acido boronico nella rilevazione di  $\beta$ -lattamasi AmpC (18). In particolare è possibile sottolineare che la cloxacillina non ha evidenziato più ceppi produttori di AmpC rispetto all'acido boronico ma in alcuni casi ha reso più semplice la lettura del test fenotipico.

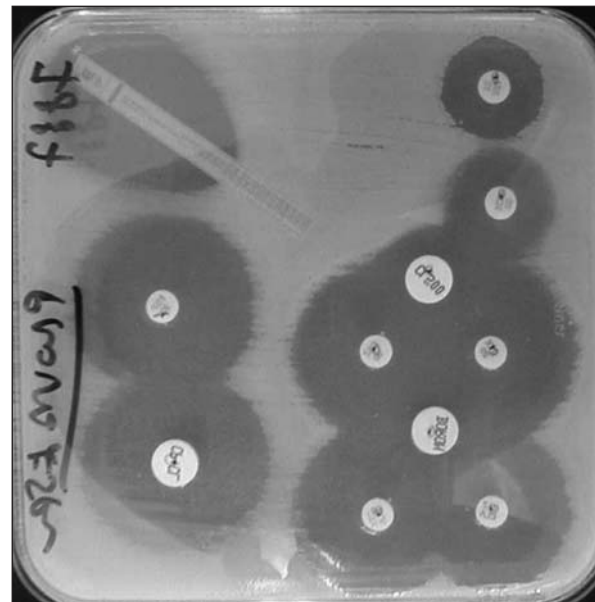
Nonostante le diverse dimensioni dei dischetti utilizzati

(ROSCO 10mm e BD 6 mm), non si sono incontrati particolari problemi nella rilevazione del sinergismo.

La nostra esperienza ci porta a proporre questo metodo fenotipico come sensibile, economico facile da eseguire e da interpretare, raccomandandolo nella routine di laboratorio con una sensibilità e specificità sui ceppi testati del 100%.

L'utilizzo di questo test potrebbe portare ad un significativo incremento delle segnalazioni di AmpC nei laboratori anche se per una precisa classificazione epidemiologica è necessario identificare le famiglie dei ceppi produttori di AmpC con i metodi molecolari.

Tra i produttori di AmpC plasmide-mediati 12 ceppi (26.7%) sono stati isolati in emocolture: 4 nel periodo 2005 – 2006 e 10 2007 – 2008. Questo dato indica un progressivo aumento di questi isolamenti in soggetti a rischio, dove una tempestiva e corretta decisione terapeutica risulta quanto mai indispensabile (10).

**Figura 1.** *E. coli* negativo per  $\beta$ -lattamasi.

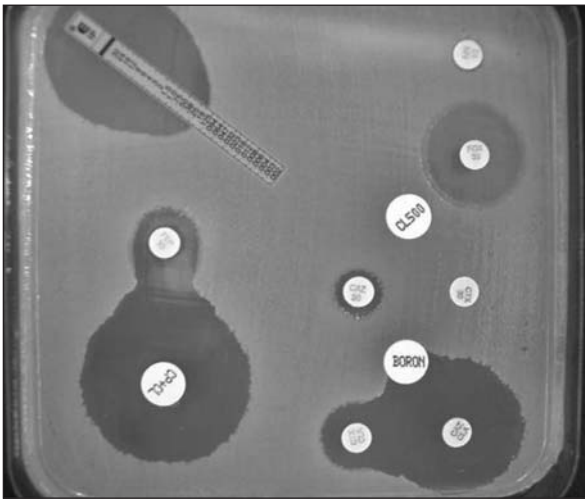


Figura II. E.coli ESBL +.

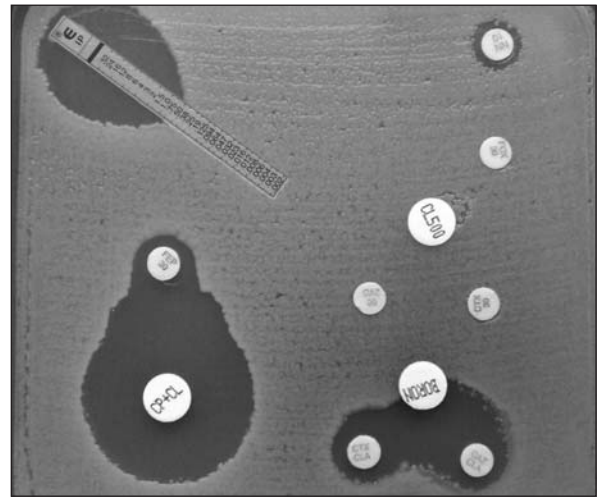


Figura V. E.coli CMY-2 e ESBL+.

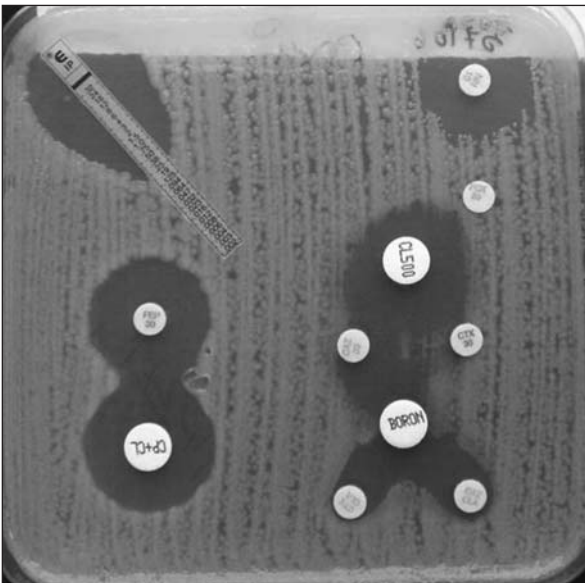


Figura III. E.coli CMY-2.

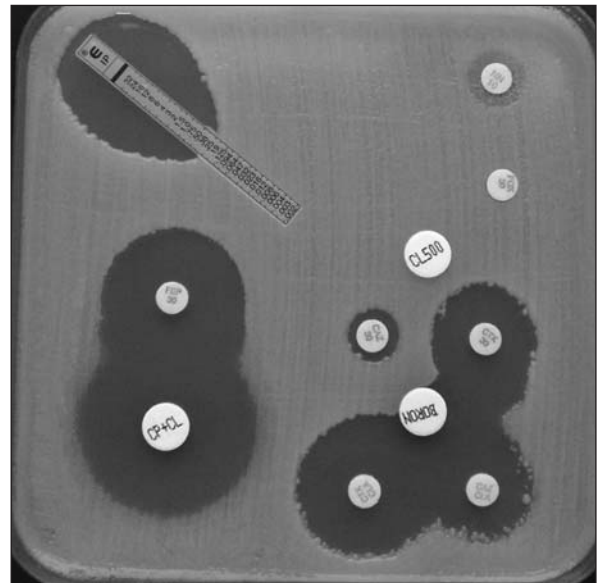


Figura VI. K.pneumoniae DHA e ESBL+.

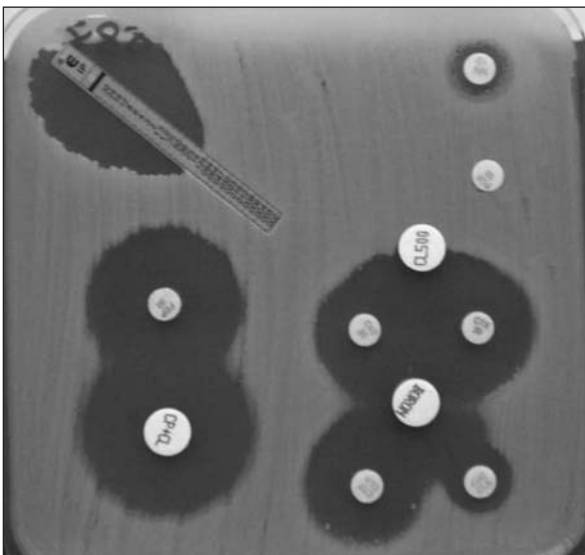


Figura IV. K. pneumoniae DHA.

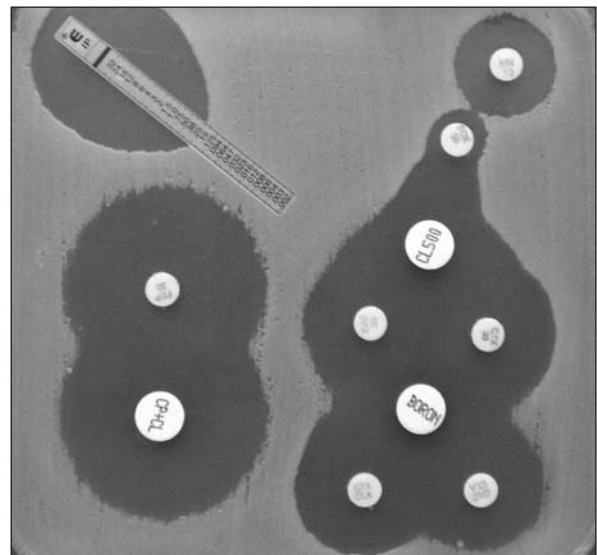


Figura VII. E. coli iperproduttore.

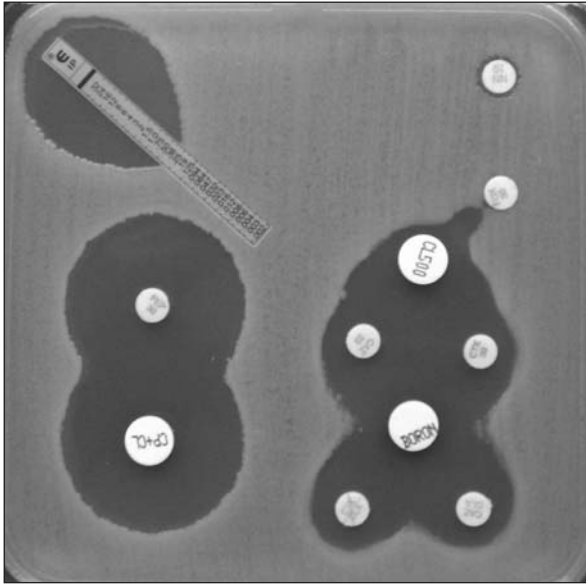


Figura VIII. E.coli CMY-2 e iperproduttore.

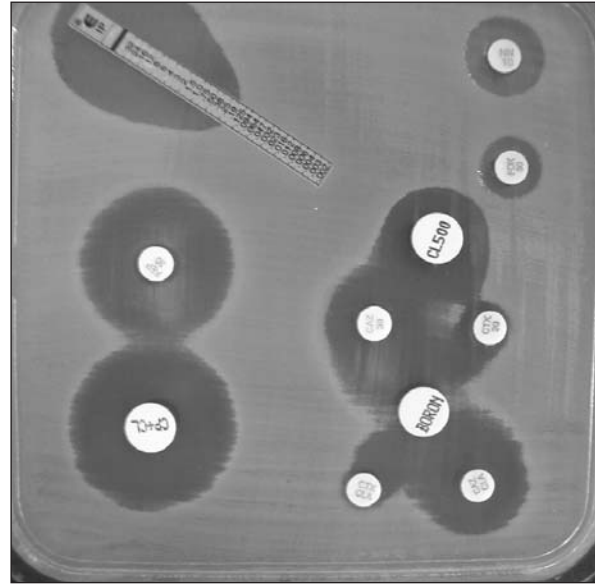


Figura IX. P.mirabilis CMY-16.

### Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il dott David M. Livermore e la prof. ssa Laura Pagani per la loro preziosa collaborazione e per aver fornito i ceppi di controllo.

### BIBLIOGRAFIA

- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance ? Focus on beta-lactamases. *Drugs Resistance Updates* 2006; 9: 142-156.
- Barlow M., Hall GB. Origin and evolution of the AmpC  $\beta$ -Lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1190-1198.
- Bauerfeind A, Schneider I, Jungwirth R, et al. A novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *K. pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1924-1931.
- Corvec S, Caroff N, Espaze F, et al. 11 Mutation in the ampC Promoter Increasing resistance to  $\beta$ -Lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3265-3267.
- D'Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, et al. CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 618-624.
- Doi, Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 191-197.
- Jacoby, GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rew* 2009; 22: 161-182.
- Livermore DM, Brown DF. Detection of  $\beta$ -lactamases mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: S59-64.
- Livermore DM, Paterson DL. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in resistance. Pocket guide. Current Medicine Group 2006.
- Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM, et al. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 3: 328-333.
- Marchese A, Arlet G, Schito GC, et al. Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 464-467.
- Migliavacca R., Nucleo E, D'Andrea MM, et al. Acquired AmpC type  $\beta$ -lactamases and emerging problem in Italian long-term care and rehabilitation facilities. *New Microbiol* 2007; 30: 295-298.
- Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 2007; 115: 1400-1408.
- M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi GM, et al. Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type  $\beta$ -Lactamases exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in a Leeds hospital. *J Antimicrob Chemother* 1997; 1997; 40:823-831.
- Neo - Sensitabs. (ROSCO). Detection of Beta-Lactamases. 09-2007/2008. Chapter 16.
- Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153-2162.
- Raglio A, Grigis A, Migliavacca R, Arosio M, Vailati F, Passera M, Pagani L, Goglio A. Rilevazione di ceppi di enterobatteri ESBL e AMPC (CLB) con test di sinergismo con acido borbonico e con cloxacillina. Congresso AMCLI, Stresa. 2008. P-66.
- Roche C, Boo TW, Walsh F, et al. Detection and molecular characterization of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 616-618.
- Russell H, Robert H. Enterobacteriaceae with AmpC. *ARMRL*. Yohei Doi, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C  $\beta$ -lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 191-197.