

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

COMPREENSÃO DE MECANISMOS FENOTÍPICOS E
GENOTÍPICOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE β -
LACTAMASES DO TIPO AmpC EM
ENTEROBACTERIACEAE

Gabrielli Stefaninni Santiago

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**COMPREENSÃO DE MECANISMOS FENOTÍPICOS E
GENOTÍPICOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE β -
LACTAMASES DO TIPO AmpC EM
ENTEROBACTERIACEAE**

Gabrielli Stefaninni Santiago

Sob a Orientação da Professora Doutora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Coorientação de
prof. Dra. Helena Maria Neto Ferreira

e

prof. Dra. Irene da Silva Coelho

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S231c SANTIAGO, GABRIELLI STEFANINNI, 1986-
COMPREENSÃO DE MECANISMOS FENOTÍPICOS E
GENOTÍPICOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES DO
TIPO AmpC EM ENTEROBACTERIACEAE / GABRIELLI
STEFANINNI SANTIAGO. - 2017.
106 f.: il.

Orientadora: SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO.
Coorientadora: IRENE DA SILVA COELHO.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2017.

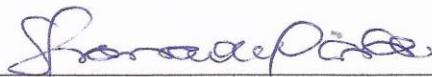
1. AmpC. 2. Beta-lactamases. 3. Resistência
Antimicrobiana. 4. Saúde Pública. 5. Enterobactérias.
I. COELHO, SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA , 1980-,
orient. II. COELHO, IRENE DA SILVA, 1979-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GABRIELLI STEFANINI SANTIAGO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

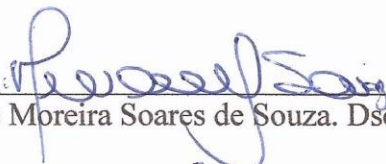
TESE APROVADA EM 21/02/2017.



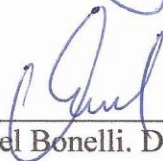
Shana de Mattos de Oliveira Coelho. Dsc. UFRRJ
(Orientadora)



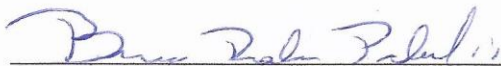
Irene da Silva Coelho. Dsc. UFRRJ
(Co-orientadora)



Miliane Moreira Soares de Souza. Dsc. UFRRJ



Raquel Bonelli. Dsc. UFRJ



Bruno Rocha Pribul. Dsc. FIOCRUZ



Ciro César Rossi. Dsc. UFRJ

**“Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!**

**Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é o que espelhou o céu.”**

X – Mar Português. Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus. Primeiro pela vida, e por todas as bênçãos que me dá a cada raiar do Sol, pela minha família e meus amigos. Em todos os momentos difíceis, mesmo sem perceber, Ele esteve ao meu lado e mostrou-me caminhos para a solução dos meus problemas e sofrimentos - obrigada, meu Deus, pela oportunidade de viver alguns meses em outro país, viver momentos tão maravilhosos e conhecer pessoas incríveis, que tornaram minha estada sempre tão prazerosa -. Acredito que esse foi o momento mais nobre vivido até então, o qual pude aprender sobre a vida, a amizade, a confiança, o respeito. Essa experiência proporcionou meu crescimento pessoal e profissional.

Obrigada: pai e mãe pela vida, por toda paciência, confiança e por estarem ao meu lado em todos os momentos pelos quais passei, e às vezes mesmo sem entender as razões terem apoiado-me em minhas atitudes e escolhas. Amados irmãos, mesmo apesar da distância e dos poucos momentos juntos, sempre estivemos próximos pelo amor que nos une e pela amizade e companheirismo que nos foi ensinado pelos nossos pais. Vocês estão sempre comigo, e as orações e pensamentos positivos dedicados a mim, foram alimento para essa conquista. Não podia esquecer-me de agradecer ao amor sincero da Mell, nossa pelucinha, que alegra nossas vidas e foi razão para a escolha da minha profissão (*in memorian*). Sempre amarei-te, Mellzinha. E, claro, como esquecer da adorável Ana Clara que encanta nosso universo com suas canções, histórias e travessuras; obrigada por seu carinho, Clarinha.

Querido avô, obrigada por tudo. Obrigada a minha querida avó, Francisca (*in memorian*), que sempre lembrou-se de mim em suas orações e torcia pelo meu sucesso; queria que estivesse conosco para compartilhar mais esta conquista mas sei que está a interceder por mim mesmo à distância.

Amigos: Ana Cláudia Miranda, Andresa Guimarães, Camila Magalhães, Fernanda Taran, Fernanda Godoi, Greici Bronzato, Ramon Pimenta, Thaís Kishi, obrigada pelo apoio e incentivo, pelos momentos alegres e divertidos, pelas conversas e orações. Vocês são especiais em minha vida.

Amo todos vocês!

Professora doutora Shana, obrigada pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação desde a graduação. Esse tempo que trabalhamos juntas foi engrandecedor e o estímulo que me ofereceu foi fundamental para a qualidade final alcançada.

Professoras doutora Irene e doutora Miliane, obrigada pela orientação durante o mestrado e doutorado. Obrigada por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, conselhos e orações.

Agradeço aos colegas do LaBacVet, especialmente às pós graduadas Naiara Rodrigues, Bianca Soares, Dayanne Melo e Marisol Gomez, e às estagiárias Beatriz Faria e Karen Santarém, pelo auxílio na execução deste trabalho. Obrigada a todos pela ajuda desde as coletas até o sequenciamento dos genes, inclusive durante os meses em que estive na instituição externa.

Aos colegas e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, UFRRJ, muito obrigada pelos anos de trabalho juntos, especialmente às secretárias Angélica e Vera.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, prof. doutor José Luis Fernando Luque Alejos, aos professores e funcionários do Instituto de Veterinária e do Prédio de Sanidade Animal (PSA), da UFRRJ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa agraciada durante o doutorado e pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em uma instituição externa – Universidade do Porto.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelos projetos que nos foram contemplados.

À Amy e ao professor doutor Bruno Gomes de Castro (LabDIC – UFMT), obrigada pela contribuição neste trabalho.

À professora doutora Helena Maria Neto Ferreira, por me receber em seu laboratório, por todo auxílio durante os experimentos, pelo grande enriquecimento pessoal e profissional que me proporcionou durante o período em que estive em Porto: muito obrigada por tudo.

Doutora Daniela, obrigada pelos momentos compartilhados durante os experimentos, por me passar um pouco do seu conhecimento, por ser sempre tão atenciosa e preocupada comigo.

Marisa Pinto, obrigada por tudo: desde a minha recepção sempre muito atenciosa, companheira e confidente.

Leonardo Andrade Neves, obrigada por todo auxílio intelectual, paciência e amizade.

Agradeço imensamente aos colegas do laboratório de bacteriologia da UP, em especial aos que me doaram um pouco do seu tempo e paciência contribuindo para a execução desta tese. Diana, Ana Isabel, Tânia, Patrícia, Josman, Margarida, Ana, Nelma, Raquel, obrigada por tudo! Agradeço também aos funcionários da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto que sempre me foram tão atenciosos, em especial à prof. doutora Maria de São José Nascimento e à Cristina Costa.

Aos amigos que conheci no Porto, pelos momentos proporcionados durante minha estada no Porto: Fernanda Brito, Vinícius, Alexandre, Janio, Polyana, Henrique, Jane, Marisa Pedrosa, Gabrielle, Filipe, Lúcio, Augusto, Rudra, Kostantine, Camila, Agnelo, Juliana, HouYem, obrigada. Desejo muito sucesso a vocês. Guardarei ótimas lembranças dos nossos momentos juntos e espero revê-los em breve.

BIOGRAFIA

Gabrielli Stefaninni Santiago, ingressou no curso de Medicina Veterinária – da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – no ano de 2007, diplomando-se em janeiro de 2012.

Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Virologia e Imunologia e monitora nas disciplinas de Sanidade Avícola, Anatomia Patológica Geral, Microbiologia Geral e Histologia Animal.

Estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do período de 2010 a 2012, realizando projetos na área de mastite bovina. Foi bolsista de iniciação científica da Faperj em 2011 com o projeto intitulado “Formação de biofilme durante as diferentes fases da curva de crescimento em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina”, sob a orientação da professora Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

Em 2012, foi aprovada no processo de seleção do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

Ingressou no doutorado do mesmo curso de pós-graduação, em setembro de 2013, após ser aprovada no processo de mudança de nível da CAPES.

Realizou estágio no laboratório de Microbiologia na Faculdade de Farmácia, na Universidade do Porto (Portugal) no período de janeiro a julho de 2015, sob coorientação da professora doutora Helena Maria Neto Ferreira. Durante sete meses de estágio aprendeu técnicas utilizadas em sua tese, como focagem isoelétrica e conjugação bacteriana.

RESUMO

SANTIAGO, Gabrielli Stefaninni. **Compreensão de Mecanismos Fenotípicos e Genotípicos Relacionados à Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae.** 106p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A produção de β -lactamase tipo AmpC em Enterobacteriaceae é relatada em todo o mundo e tem grande importância clínica e epidemiológica devido à restrição terapêutica, dificuldade de detecção, disseminação de AmpC plasmidiais e mutação do gene natural ocasionando multirresistência aos antimicrobianos, no caso de produtores de ESAC (AmpC de Espectro Estendido). Neste estudo, foi realizado um ensaio inicial de pesquisa da produção de AmpC considerando dois grupos de enterobactérias, suspeitamente produtoras da enzima, 18 isoladas de amostras clínicas humanas (FFUP - Portugal) e 20 de leite mastítico bovino (UFRRJ - Brasil), respectivamente. Posteriormente, 238 cepas de *Escherichia coli*, provenientes de fazendas leiteiras brasileiras, foram investigadas quanto à produção de AmpC segundo as metodologias fenotípicas e bioquímicas previamente desenvolvidas, além da pesquisa genotípica por PCR (ACC, AmpC universal, ampR, CIT, CMY, DHA, EBC, MOX e FOX). O sequenciamento do promotor e do gene inteiro *ampC* foi realizado em 12 cepas para avaliar mutações referentes à super produção da enzima e produção de ESAC. Todas as cepas de origem humana se mostraram fenotipicamente produtoras de AmpC sendo confirmadas em 72,2% delas pelo teste de inibição com ácido borônico (AB) e pI 9 em 44,5%. A técnica de PCR revelou: AmpC universal em 83,4% das cepas, CIT em 66,7%, CMY em 16,7% e DHA em 55,6%. Apesar de 61,1% destas cepas apresentarem suspeita de *ampC* plasmidial, apenas em 38,9% foi confirmada a presença do elemento móvel. Não foi possível observar a inibição completa pela cloxacilina nem nas doadoras nem nas receptoras. Dentre os 20 cepas de enterobactérias de origem animal, apenas uma cepa de *Proteus mirabilis* demonstrou características fenotípicas de produtora de AmpC cuja transferência do gene foi confirmada por conjugação. Possivelmente, as demais cepas tenham perdido o plasmídeo de resistência durante o transporte à FFUP, o que justificaria a suspeita inicial de produção da enzima. Dentre as 238 cepas de *E. coli*, 11,76% apresentou diminuída suscetibilidade à cefoxitina, característica de pAmpC ou super produtoras de AmpC ou ESAC. Não houve confirmação da produção de AmpC por inibição com cloxacilina, por AB nem pela determinação de MIC. Foi possível confirmar a ausência de pAmpC por PCR e também por conjugação. Frente a estes resultados, 2 cepas suspeitas de super produzirem a enzima e 4 suspeitos de produzirem ESAC foram analisadas quanto à mutações na região promotora e verificou-se que 3 cepas (2 suspeitos) possuem mutações na região promotora (-1, +58) sugerindo o mecanismo de super produção de AmpC. O sequenciamento do gene inteiro demonstrou mutações responsáveis pelas variações de aminoácidos nas regiões do Ω loop (191, 209) e R2 (298, 300, 304). Todas as cepas analisadas apresentaram variações nas regiões responsáveis pela maior flexibilidade da enzima propiciando a hidrólise de outros β -lactâmicos, como o cefepime. Desta forma, o estudo permitiu um importante levantamento de dados epidemiológicos sobre os genes de resistência em enterobactérias circulantes no hospital português estudado e detectou-se, pela primeira vez, mutações sugestivas de super produção de AmpC e produção de ESAC em *E. coli* provenientes de amostras circulantes no rebanho bovino brasileiro.

Palavras-chave: ESAC, conjugação, pAmpC, ponto isoelétrico, promotor de AmpC.

ABSTRACT

SANTIAGO, Gabrielli Stefaninni. **Comprehension of Phenotypic and Genotypic Mechanisms Related to AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae.** 106p. Thesis (PhD in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The production of AmpC-type β -lactamase in Enterobacteriaceae is reported worldwide and has great clinical and epidemiological importance due to the therapeutic restriction, detection difficulty, dissemination of plasmid AmpC and mutation of the natural gene causing multidrug resistance in the case of ESAC producers (Extended Spectrum AmpC). In this study, AmpC production was carried out considering two groups of enterobacteria, suspected of producing the enzyme: 18 strains from human clinical specimens (FFUP - Portugal) and 20 from bovine mastitic milk (UFRRJ - Brazil), respectively. After this, a total of 238 *Escherichia coli* from Brazilian dairy farms were used to detect AmpC according to previously developed phenotypic and biochemical methodologies, and by PCR (ACC, AmpC universal, ampR, CIT, CMY, DHA, EBC, MOX and FOX). Sequencing of the promoter and the entire *ampC* gene was performed on 12 strains to evaluate mutations related to AmpC overproduction and ESAC production. All isolates of human origin were phenotypically expressed as AmpC producers and were confirmed in 72.2% by the inhibition test with boronic acid (AB) and pI 9 in 44.5%. The PCR technique revealed: AmpC universal in 83.4%, CIT in 66.7%, CMY in 16.7% and DHA in 55.6%. Although 61.1% of these isolates suspected plasmidial *ampC* only 38.9% presented the mobile element. Complete inhibition by cloxacillin could not be observed in either donor or recipient. Of the 20 animal enterobacteria isolates, only one *Proteus mirabilis* demonstrated phenotypic characteristics of AmpC producer whose gene transfer was confirmed by conjugation. Possibly, the other isolates lost the resistance plasmid during transport to the FFUP, which would justify the initial suspicion of enzyme production. Among the 238 *E. coli*, 11.76% presented decreased susceptibility to cefoxitin, characteristic of pAmpC or super producers of AmpC or ESAC. There was no confirmation of AmpC production by inhibition with cloxacillin and AB nor by MIC determination. The absence of pAmpC was confirmed by PCR and also by conjugation. Two isolates suspected of overproducing the enzyme and 4 ESAC suspects were analyzed for the promoter region and entire gene. Three isolates (2 suspects) were found to have mutations at the promoter region (-1, +58) confirming the overproduction of AmpC. Entire gene sequencing demonstrated mutations responsible for amino acid variations in the Ω loop regions (191, 209) and R2 (298, 300, 304). All the analyzed strains presented variations in the regions responsible for the greater flexibility of the enzyme, propitiating the hydrolysis of other β -lactams, such as cefepime. Thus, the study allowed an important survey of epidemiological data on resistance genes in circulating enterobacteria in the studied Portuguese hospital and it is the first report of mutations suggesting overproduction of AmpC and ESAC detection in *E. coli* in Brazilian cattle dairy samples.

Keywords: AmpC promoter, conjugation, ESAC, isoelectric point, pAmpC.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Representação da estrutura da enzima AmpC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – modelo de produtor natural de AmpC - ligada a um inibidor representado pela molécula em cor verde.	6
Figura 2	Modelo da indução transcricional de <i>ampC</i> pela exposição à cefoxitina ou cefotaxima, em <i>Enterobacter cloacae</i> .	9
Figura 3	Fluxograma resumido da metodologia adotada para detecção e confirmação de AmpC.	25
Figura 4	Mapa da região Sul Fluminense do estado do Rio de Janeiro.	27
Figura 5	Mapas das regiões onde foram coletadas as amostras de leite e fezes para o estudo.	28
Figura 6	Identificação bioquímica de enterobactérias pelo kit ID32GN (Biomérieux).	29
Figura 7	Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa.	30
Figura 8	CHROMagar <i>orientation</i> .	40
Figura 9	Teste de suscetibilidade antimicrobiana realizado para confirmação do fenótipo de resistência codificado por enzimas AmpC.	41
Figura 10	Teste de inibição da AmpC pela cloxacilina.	43
Figura 11	Teste de inibição da AmpC pelo ácido borônico.	44
Figura 12	Produtos positivos da PCR para <i>ampC</i> em gel de agarose 2%.	46
Figura 13	Conjugação em meio sólido e em meio líquido.	49
Figura 14	Teste de inibição da AmpC pela cloxacilina em bactérias transconjugantes.	52
Figura 15	Reação do extrato bruto com nitrocefina.	53
Figura 16	Focagem isoeletrica.	54
Figura 17	Microplaca de ELISA do teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) com cefoxitina após adição de resazurina.	61
Figura 18	Alinhamento das sequências da região promotora e atenuadora de <i>ampC</i> .	66
Figura 19	Alinhamento das sequências de aminoácidos das cepas estudadas.	67

ÍNDICE DE QUADROS

		Pág
Quadro 1	Classificação de β -lactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby (2010)	5
Quadro 2	Enzimas AmpC plasmidiais descritas em Enterobacteriaceae, no mundo	13-19
Quadro 3	Características das enterobactérias provenientes de amostras clínicas humanas	26
Quadro 4	Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo o CLSI (2013; 2014)	30
Quadro 5	Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006)	35
Quadro 6	Antimicrobianos utilizados na avaliação de resistência associada, nos transconjugantes e bactérias doadoras, e seus respectivos pontos de corte	36
Quadro 7	<i>Primers</i> para pesquisa de β -lactamases AmpC	37
Quadro 8	Cepas selecionadas para sequenciamento da região promotora e gene inteiro AmpC e suas características fenotípicas e genotípicas bem como a suspeita de enzima produzida	38

ÍNDICE DE TABELAS

		Pág
Tabela 1	Avaliação e confirmação das características fenotípicas de resistência AmpC nas enterobactérias estudadas e nas cepas controle dos ensaios	42
Tabela 2	Avaliação e confirmação das características fenotípicas de resistência AmpC nas enterobactérias estudadas e na cepa <i>Escherichia coli</i> CMY-2 usada como controle do ensaio: avaliação do diâmetro do halo (mm) formado em torno do disco de cefoxitina e em torno do disco de cefoxitina adicionado AB	44-45
Tabela 3	Resultados da detecção dos genes AmpC por PCR, nas enterobactérias estudadas	46
Tabela 4	Técnicas de conjugação para obtenção de transconjugantes: colônias não fermentadoras de lactose e resistentes à cefoxitina e à estreptomicina	48
Tabela 5	Os perfis fenotípicos e genotípicos das bactérias doadoras e de seus transconjugantes (T) obtidos a partir do método em meio líquido por 6 horas	50
Tabela 6	Perfis de resistência e perfis genotípicos das cepas e em seus transconjugantes (T)	51
Tabela 7	Dados referentes à identificação, perfil de resistência, avaliação de antagonismo e amplificação do gene <i>ampC</i>	56
Tabela 8	Teste de inibição da enzima AmpC pela adição de ácido borônico ao disco de cefoxitina	57
Tabela 9	Resultados fenotípicos e genotípicos da bactéria doadora, cepa 3, <i>Proteus mirabilis</i> , e seu transconjugante (T)	58
Tabela 10	Resultados referentes aos testes fenotípicos empregados na confirmação da produção de AmpC, à extração enzimática e à conjugação, e à detecção por PCR do gene <i>ampC</i> nas cepas de <i>Escherichia coli</i> com diminuída suscetibilidade à cefoxitina	61-62
Tabela 11	Correlação dos resultados fenotípicos, genotípicos e estudo do gene completo e de seu promotor segundo a suspeita de enzima produzida pelas cepas de <i>Escherichia coli</i>	65

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
° C	graus Celsius
AB	Ácido borônico
AMC	Ágar Mac Conkey
AMH/ MH	Ágar Müller-Hinton
ABHI	Ágar infusão de cérebro e coração
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CLED	Ágar cistina-lactose deficiente em eletrólitos (Cystine Lactose Electrolyte Deficient)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>Ent. agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESAC	AmpC de Espectro Estendido
ESBL	β-lactamases de Espectro Estendido
g	Unidade de aceleração
h	Horas
<i>H. alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Hz	Hertz
IEF	Focagem isoelétrica (Isoelectric focusing)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Daltons
KESC	Grupo composto por: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Bactérias multirresistentes
mg	Miligramas
Mg ₂ Cl	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
<i>M. morgani</i>	<i>Morganella morgani</i>
n	Número de isolados
NA	Ácido nalidíxico (Nalidixic Acid)

NaCl	Cloreto de sódio
pAmpC	AmpC plasmidial
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
pmol	picomol
PMQR	Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. rubidae</i>	<i>Serratia rubidae</i>
TSB	Caldo tripticase de soja (Trypticase soy broth)
U	unidades
UFC	Unidades formadoras de colônias
UI	Unidade internacional
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V	volts
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 PRODUÇÃO DE B-LACTAMASES.....	3
2.2 B-LACTAMASE TIPO AMPC.....	3
2.3 REGULAÇÃO DE AMPC	8
2.4 SUPER PRODUÇÃO DE AMPC EM ESCHERICHIA COLI.....	9
2.5 AMPC DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESAC) – UM NOVO TIPO DE AMPC	10
2.6 EPIDEMIOLOGIA DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORES DE AMPC.....	11
2.7 FATORES DE RISCO QUE CONTRIBUEM PARA A DISSEMINAÇÃO DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE AMPC E MEDIDAS DE CONTROLE	20
2.8 QUIMIOTERAPIA ANTIMICROBIANA PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORES DE AMPC	20
2.9 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE AMPC.....	22
3 OBJETIVO	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 AMOSTRAGEM.....	26
4.1.1 <i>Cepas estudadas na FFUP: enterobactérias isoladas de casos clínicos humanos de Portugal e enterobactérias isoladas de leite mastítico bovino brasileiro</i>	26
4.1.2 <i>Cepas estudadas na UFRRJ: Escherichia coli isoladas de leite mastítico e de fezes de rebanhos bovinos leiteiros do Brasil</i>	27
4.2 CEPAS CONTROLE.....	28
4.3 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS.....	29
4.3.1 <i>CHROMagar orientation</i>	29
4.3.2 <i>Identificação bioquímica</i>	29
4.4 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA DE B-LACTAMASE AMPC.....	29
4.4.1 <i>Difusão em ágar e avaliação de antagonismo</i>	29
4.4.2 <i>Inibição pela cloxacilina</i>	31
4.4.3 <i>Inibição pelo ácido borônico</i>	31
4.4.4 <i>Concentração inibitória mínima (MIC) com cefoxitina</i>	31
4.4.5 <i>Concentração inibitória mínima (MIC) com cefoxitina e cloxacilina</i>	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE B-LACTAMASE TIPO AMPC.....	32
4.5.1 <i>Preparação do extrato bruto</i>	32
4.5.2 <i>Avaliação prévia do extrato bruto</i>	33
4.5.3 <i>Determinação do ponto isoelétrico da β-lactamase</i>	33
4.5.4 <i>Identificação da β-lactamase por focagem isoelétrica</i>	33
4.6 AVALIAÇÃO DA ORIGEM PLASMIDIAL DO GENE POR CONJUGAÇÃO	33
4.6.1 <i>Seleção das espécies doadoras de plasmídeo conjugativo</i>	33
4.6.2 <i>Preparo dos isolados para conjugação</i>	34
4.6.3 <i>Conjugação bacteriana</i>	34
4.6.3.1 <i>Conjugação em meio sólido</i>	34
4.6.3.2 <i>Conjugação em meio líquido</i>	34
4.6.4 <i>Seleção das transconjugantes</i>	34
4.6.5 <i>Confirmação da transferência de AmpC</i>	35

4.6.6	<i>Avaliação de transferência de resistência associada</i>	35
4.7	CONFIRMAÇÃO GENOTÍPICA DE B-LACTAMASE AMPC	36
4.7.1	<i>Extração de DNA por lise térmica</i>	36
4.7.2	<i>Técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de agarose</i>	36
4.8	SEQUENCIAMENTO DE AMPC	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	CEPAS ESTUDADAS NA FFUP: ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE CASOS CLÍNICOS HUMANOS DE PORTUGAL E ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO BRASILEIRO.....	40
5.2	CEPAS ESTUDADAS NA UFRRJ: ESCHERICHIA COLI ISOLADOS DE LEITE MASTÍTICO E FEZES DE REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO BRASIL	59
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS	70
ANEXOS		87
ANEXO 1	- PREPARO DOS DISCOS DE CEFOXITINA COM ÁCIDO BORÔNICO	87
ANEXO 2	- ALINHAMENTO DO GENE AMPC DE ESCHERICHIA COLI PROVENIENTES DE REBANHO LEITEIRO BRASILEIRO UTILIZANDO O PROGRAMA MEGA V7.....	88
ANEXO 3	- QUADRO DE CÓDIGOS DE AMINOÁCIDOS, SEGUNDO A IUPAC.	90

1 INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* contém 44 gêneros e mais de 170 espécies de bactérias Gram negativas que habitam diversos ambientes inclusive os de produção animal, e podem ocasionar doenças em animais e em humanos (Koneman et al., 2010; Liebana et al., 2013).

O tratamento de infecções ocasionadas por estas bactérias é realizado administrando-se, principalmente, antimicrobianos da classe β -lactâmicos. No entanto, logo após a descoberta do primeiro antibiótico desta classe, a penicilina, relatou-se a produção de enzimas capazes de hidrolisar esta molécula, tornando-a inativa. A produção de β -lactamases em Gram negativos é o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos devido ao seu armazenamento no espaço periplasmático (Fleming, 1929; Barlow e Hall, 2002; Marsik and Nambiar, 2011; Zeng e Lin, 2013; Kateregga et al., 2015).

As β -lactamases foram estudadas e classificadas segundo a homologia de aminoácidos da molécula (Ambler, 1980) e segundo a função enzimática (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). As β -lactamases AmpC são cefalosporinases pertencentes à classe molecular C e ao grupo funcional 1, e geralmente são resistentes à inibição pelo ácido clavulânico e confere resistência às cefamicinas, como a cefoxitina (Bush et al., 1995; Bush e Jacoby, 2010). O ponto isoelétrico e o peso molecular também auxiliam na classificação das β -lactamases (Ambler, 1980; Jaurin e Grunsdrom, 1981; Bush et al., 1995). Algumas enterobactérias são naturalmente produtoras destas enzimas e sua produção é induzida pelo uso de alguns antimicrobianos, como o imipenem (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). Dentro deste grupo, há bactérias que superexpressam constitutivamente esta enzima devido às mutações no gene repressor do gene *ampC* (Dias, 2009). Um fator preocupante em todo o mundo é a presença de enterobactérias produtoras de AmpC pela presença de plasmídeos contendo genes codificantes destas enzimas e também de genes de resistência a outras classes antibióticas (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; David e Paterson, 2006; Pavez et al., 2008; Bortolaia et al., 2014; Cottell et al., 2014).

Nos últimos anos, a produção de β -lactamases do tipo AmpC tem contribuído com alto índice de resistência aos β -lactâmicos principalmente devido à aquisição de plasmídeos contendo o gene codificante dessas enzimas (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Yagi et al., 2005). A classificação das enzimas AmpC plasmidiais é baseada na codificação de origem cromossômica, diferenciando-se em seis grupos com similaridade genética: ACC (originado de *Hafnia alvei*), FOX (originado de *Aeromonas* spp.), MOX (originado de *Aeromonas* spp.), DHA (originado de *Morganella morganii*), CIT (originado de *Citrobacter freundii* e de *Aeromonas* spp.), EBC/ENT (originado de *Enterobacter cloacae*) (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Livermore e Woodford, 2006; Rapoport et al., 2008; Pavez et al., 2008). Atualmente, além das enterobactérias naturalmente produtoras de AmpC e as que adquiriram AmpC plasmidiais, relata-se a mutação do gene que colabora para a mudança de atividade enzimática, as denominadas ESAC (Mammeri et al., 2008; Haenni et al., 2014; Pires et al., 2015).

A produção desta enzima ainda é subestimada em muitos laboratórios humanos e animais, comparadamente aos dados referentes à produção de ESBL (β -lactamases de espectro estendido), e relacionam esta negligência à dificuldade de detecção da enzima e ausência de técnicas padronizadas para tal (Steward et al., 2000; Thomson, 2001; Shahid et al., 2004; Husickova et al., 2012). Frente a esta realidade, a realização de diversos testes laboratoriais que confirmem esta produção enzimática confere maior fidedignidade dos resultados e pode auxiliar na discriminação da técnica mais prática e reprodutível entre os laboratórios de pesquisa.

O tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de AmpC é complicado devido à multirresistência observada e acarreta grandes custos, tanto para humanos quanto para o tratamento de animais (Carvalho, 2009; García-Cobos et al., 2015; Sellera et al., 2015). Muitos fatores são relacionados a este evento, como o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, e a utilização de antimicrobianos em subdoses nas rações animais (Rayamajhi et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo detectar fenotípica e genotipicamente a enzima AmpC em cepas de origem animal provenientes de fazendas leiteiras brasileiras, após a padronização de técnicas para a detecção desta enzima, realizada em cepas de origem clínica humana, de modo a elucidar os mecanismos envolvidos na produção desta enzima e contribuir para uma significativa compreensão da circulação de enterobactérias resistentes no ambiente de produção leiteira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de β -Lactamases

Em 1928, Alexander Fleming observou o efeito bactericida de *Penicillium notatum* que levou à descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico β -lactâmico (Fleming, 1929). A partir de então, outros antibióticos foram descobertos ou sintetizados a partir deste composto. No entanto, Fleming já observara a resistência de algumas bactérias à penicilina, e em alguns anos observou-se a emergência da resistência aos β -lactâmicos. Alterações em PBP (transpeptidases, proteínas ligantes de penicilina), mutações em porinas e a produção de β -lactamases foram descritas como responsáveis por este evento (Fleming, 1929; Zeng & Lin, 2013).

β -lactamases são enzimas que acarretam a resistência das bactérias aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos. Atualmente, são descritas quatro classes de β -lactamases e mais de 1000 variedades destas enzimas descritas em bactérias Gram negativas, dentre elas as mais comuns são da família TEM e SHV, reportadas desde 1965 e CTX-M, reportada mais recentemente (Barlow & Hall, 2002; Dias, 2009; Tolentino, 2009; Gonçalves, 2010; Marsik & Nambiar, 2011).

As β -lactamases podem ser codificadas por genes cromossomais ou plasmidiais, sendo encontradas em Gram positivos e Gram negativos, e uma vez produzidas, ficam armazenadas no espaço periplasmático das Gram negativas enquanto se dispersam no meio quando produzidas pelas Gram positivas (Barlow & Hall, 2002; Zeng & Lin, 2013). Essas enzimas são classificadas de acordo com suas propriedades de perfil do substrato sobre os quais agem, estrutura molecular, ponto isoelétrico e peso molecular (Ambler, 1980; Jaurin & Grunsdrom, 1981; Bush et al., 1995).

Dois esquemas para a classificação das β -lactamases são utilizados: um de acordo com a homologia de aminoácidos da molécula, proposta por Ambler (1980) e outra baseada na sua atividade enzimática proposta por Bush et. al. (1995). Em 2010, a classificação funcional das β -lactamases foi atualizada por Bush e Jacoby (2010), no entanto, novas enzimas vêm sendo descritas e aos poucos são inseridas nos grupos já existentes. As novas β -lactamases estão muitas vezes relacionadas às falhas terapêuticas observadas.

2.2 β -Lactamase Tipo AmpC

Em 1940, uma β -lactamase capaz de hidrolisar a penicilina foi descrita em *Escherichia coli*. Embora não tenha recebido a nomenclatura atual, esta foi a primeira vez que se relatou a existência da AmpC (Abraham e Chain, 1940). A partir de 1965 iniciaram-se os estudos sobre esta penicilinase. A sequência genética de *ampC* foi descrita somente em 1981 (Jaurin e Grunsdrom, 1981; Jacoby, 2009).

AmpC é uma serina- β -lactamase pertencente ao grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros (1995; 2010) e à classe C de Ambler (1980; 1995). A classificação de β -lactamases mais usada é a proposta por Bush-Jacoby-Medeiros (1995; 2010) que utiliza a função enzimática para separar os grupos (Quadro 1). O Grupo 1 é composto por enzimas que hidrolisam cefamicinas (cefotaxima e cefotetan), oxi-imino-cefalosporinas (como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona), e monobactâmicos (como o aztreonam), mas em menor nível. AmpC é capaz de hidrolisar aminopenicilinas associadas com inibidores de β -lactamases (amoxicilina com

ácido clavulânico, ampicilina com sulbactam) e não age sobre cefalosporinas de quarta geração (cefepime), nem carbapenemas (Nordmann e Mammeri, 2007; Jacoby, 2009; Martínez-Rojas 2009). AmpC foi distinguida das demais serina- β -lactamases porque apesar de também conter este aminoácido em seu sítio ativo, tem origem diferente das demais e por isso tem sido descrita como serina- β -lactamase de classe C (Ambler, 1980; Jaurin e Grunstrom, 1981).

A enzima AmpC também pode ser caracterizada por suas propriedades físicas importantes na sua diferenciação dentre as outras serina- β -lactamases. Sua massa molecular varia de 34 a 40kDa e seu ponto isoelétrico é 9, embora dentro do grupo AmpC exista algumas variações de 6,4 (FOX-4) a 9,4 (LAT) (Jaurin e Grunstrom, 1981; Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009).

Como dito anteriormente, as β -lactamases AmpC não são inibidas pelos inibidores de β -Lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, tampouco são inibidas por EDTA (um inibidor de metalo-carbapenemase). Porém, alguns compostos conseguem inibir a ação hidrolítica das enzimas AmpC: cloxacilina e oxacilina, e também o ácido borônico e seus derivados (Coudron, 2005; Jacoby, 2009; Rodríguez-Martínez et al., 2009; Tondi et al., 2010; Su et al., 2012; Pires et al., 2015).

Muitas bactérias produzem naturalmente AmpC, sendo as pertencentes à família Enterobacteriaceae: *Buttiauxella agrestis*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter werkmanii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter* spp., *Erwinia rhapontici*, *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. (Jacoby, 2009). Estas bactérias possuem o gene cromossomal induzível e quando previamente expostas a agentes indutores - ampicilina, cefepime, cefoxitina ou ácido clavulânico - expressam o gene e conseqüentemente apresentam características de produtor de AmpC (Thomson, 2001; Barlow e Hall, 2002; Jacoby, 2009).

Em *Escherichia coli* e *Shigella* spp., o AmpC cromossomal não é induzível, devido à perda do gene regulador *ampR* (Jacoby, 2009; Martínez-Rojas, 2009; Al-Bayssari et al., 2015). *Proteus mirabilis* e *Klebsiella* spp. perderam o gene AmpC cromossomal, mas atualmente estas bactérias podem apresentar AmpC mediada por plasmídeo. Além destas, também há relatos de pAmpC (AmpC plasmidial) em *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* e *Enterobacter aerogenes*. A presença do gene plasmidial aumenta a prevalência do mecanismo de resistência pela disseminação entre os Gram negativos (Bauernfeind et al., 1996; Thomson, 2001; Philippon et al., 2002; Schmidtke and Hanson, 2006; Nordmann et al., 2007; Al-Bayssari et al., 2015). Observa-se que a enzima AmpC mediada por plasmídeo tem expressão constitutiva (não induzível) (Thomson, 2001).

A produção desta enzima em bactérias naturalmente produtoras tem atividade na manutenção da parede bacteriana, porém a enzima também está associada à hidrólise de 7-metoxicefalosporinas (por exemplo, cefoxitina) e pode ainda levar à resistência bacteriana a outras cefalosporinas quando há mutação genética acarretando a super produção desta enzima (Bauernfeind et al., 1996; Philippon et al., 2002).

Quadro 1. Classificação de β -lactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby (2010)

Grupo segundo Bush-Jacoby	Classe Molecular Ambler (subclasse)	Substrato	Ação de inibidores (Ác. clavulânico, sulbactam e tazobactam)	Características	Exemplo de enzimas
1	C	Cefalosporinas	Não	Melhor hidrólise de cefalosporinas do que de benzilpenicilinas; hidrolisa cefamicina.	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99, ACT-1.
1 E	C	Cefalosporinas	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima frequentemente outras oxiiimino- β -lactâmicos	GCI, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sim	Maior hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas	PCI
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de menor espectro	Sim	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Sim	Hidrólise aumentada de oxiiimino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Não	Hidrólise aumentada de oxiiimino- β -lactâmicos combinadas com a resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbencilinas	Sim	Hidrólise aumentada de carbencilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilinas, cefepime	Sim	Hidrólise aumentada de carbencilina, cefepime e cefpiroma	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oxiiimino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Hidrólise de cefalosporinas, inibida por ácido clavulânico mas não por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemas	Variável	Hidrólise aumentada de carbapenemas oxiiimino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenemas	Não	Hidrólise de amplo-espectro incluindo carbapenemas mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemas	Não	Hidrólise preferencial de carbapenemas	CphA, Sfh-1

A expressão aumentada da enzima pode ser gerada devido a mutações no promotor de *ampC* ou no seu atenuador levando a uma expressão exagerada (Philippon et al., 2002). As descrições de inserção ou deleção mais frequentes no promotor de AmpC em *Escherichia coli* que levam a esta superexpressão são nas posições: -88, -82, -42, -18, -1 e +58 (Olsson, 1983; Caroff et al., 2000). Além destes fatores, mutações na hélice H-10 da β -lactamase AmpC podem alterar a conformação do sítio ativo da enzima afetando assim a sua atividade hidrolítica, aumentando o espectro de ação para outras cefalosporinas (Figura 1) (Sohn et al., 2008; Pires et al., 2015). A hiperprodução de AmpC não acarreta resistência ao cefepime, mas isso pode ser causado pela produção de uma ESBL (β -lactamase de espectro estendido) concomitante, ou de uma AmpC de espectro estendido (ESAC) (Thomson, 2001; Nasim et al., 2004; Mammeri et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

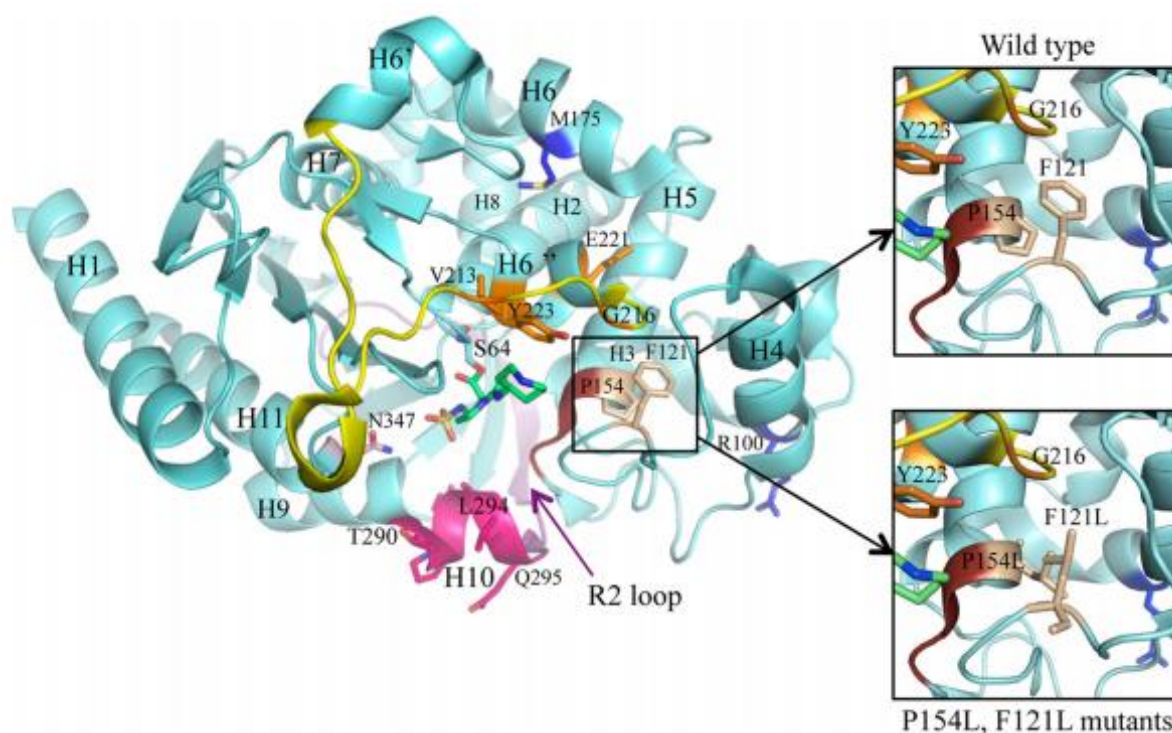


Figura 1. Representação da estrutura da enzima AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* – modelo de produtor natural de AmpC - ligada a um inibidor representado pela molécula em cor verde. As principais regiões possíveis de alterações na atividade enzimática estão representadas pelas cores como a seguir: alça ômega – amarelo; hélice H-10 – rosa; alça R2 – roxo; e YSN – laranja. Fonte: Berrazeg et al. 2015.

Em 1989, Bauernfeind e colaboradores relataram a primeira cefamicinase mediada por plasmídeo em uma *Klebsiella pneumoniae* isolada na Coréia do Sul. Esta cepa transferiu a resistência às cefamicinas (cefotetana e cefoxitina) e também a penicilinas, oximinocefalosporinas e monobactâmico para *Escherichia coli*. Esta cefamicinase foi classificada pelo ponto isoeletrico (8,0) que sugeriu sua inclusão na classe C das β -lactamases, e foi denominada CMY-1 devido à sua atividade sobre as cefamicinas. Porém, a primeira comprovação de β -lactamase de classe C plasmidial foi fornecida por Papanicolaou e colaboradores (1990). Estes pesquisadores demonstraram a transmissão da resistência a α -metoxi e oximi- β -lactâmicos mediada por uma enzima que denominaram MIR-1. Esta enzima apresentou propriedades bioquímicas de β -lactamase de classe 1 e a similaridade entre *mir-1* e *ampC* de *Enterobacter cloacae* era de 90%. Anterior a estes relatos, outros pesquisadores também observaram β -lactamase AmpC mediada por plasmídeo mas com a

perda do plasmídeo não foi possível aprofundar os estudos em *Proteus mirabilis* (Bobrowski et al., 1976), em *Proteus* ou *Salmonella* spp. (Knothe et al., 1983).

Acredita-se que as AmpC plasmidiais tenham surgido pela transferência de genes cromossomais induzíveis para plasmídeos. Segundo Olsson e colaboradores (1983), a transferência de um *ampC* de *Shigella sonnei* para *Escherichia coli* de origem clínica ocorreu por transferência horizontal, por um plasmídeo ou por um fago.

O gene *ampC* possui 1370 pb e codifica uma enzima de 377 aminoácidos (Jaurin e Grunsdrom, 1981). As pequenas diferenças na sequência de aminoácidos deram origem às famílias de AmpC (Thomson, 2001; Jacoby, 2009). As enzimas mediadas por plasmídeo podem ser divididas em seis *clusters*, de acordo com sua origem bacteriana (Nordmann e Mammeri, 2007). Algumas AmpC receberam seus nomes, de acordo com a resistência produzida, como as AmpC conhecidas até hoje são: CMY que tem afinidade por cefamicinas, FOX por cefoxitina, MOX por moxalactam, e LAT, por latamoxef (uma cefamicina de terceira geração). Outra forma de nomear é pelo tipo de β -lactamase: ACT – AmpC type, e Ambler class C que deu origem à ACC. O local ou o nome do paciente relacionado à enzima também foram referências para a atribuição da nomenclatura: Miriam Hospital in Providence, R.I. – MIR-1; Dhahran Hospital in Arábia Saudita – DHA; Bilal paciente de onde isolaram a cepa contendo a enzima BIL-1 (Philippon et al., 2002).

A enzima CMY, cujo pI varia de 8,0 a 9,2, possui seis variedades que estão relacionadas à AmpC cromossomal de *Aeromonas* spp.: CMY-1, -8, -9, -10, -11 e -19, enquanto as demais, como CMY-2, estão relacionadas com AmpC de *Citrobacter freundii*. Esta última é mediada por plasmídeo e é comumente descrita em todo o mundo. A LAT tem origem semelhante e seu pI é 9,4. O sequenciamento de algumas enzimas revelou que, apesar de nomenclaturas diferentes, algumas são idênticas e que não deveriam ter recebido outro nome quando relatadas (Bauernfeind et al., 1996; Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009). BIL-1, LAT-2 e CMY-2 foram ditas como a mesma enzima após análise das sequências por Barlow e Hall (2002), LAT-1 é idêntica a LAT-4 e LAT-3 idêntica a CMY-6. LAT e quase todos os CMY são descendentes de um gene *ampC* de *Citrobacter freundii*. CMY-1, CMY-8, CMY-9 e MOX também foram mobilizados de *Aeromonadaceae* (Barlow e Hall, 2002; Livermore e Woodford, 2006; Nordmann e Mammeri, 2007).

ACT-1 e MIR-1 são descendentes de um *ampC* de *Enterobacter cloacae* e possuem pI 8,4. DHA-1 e DHA-2, com pI 7,6 e 7,8, respectivamente, são originados de *ampC* de *Morganella morganii*. (Jacoby e Tran, 1999; Barlow e Hall, 2002; Power et al., 2006; Nordmann e Mammeri, 2007). ACC-1 (pI 7,8) é descendente de *ampC* de *Hafnei alvei*, e FOX (pI de 6,4 a 7,25) de um *ampC* de *Aeromonas sobria* (Barlow e Hall, 2002; Livermore e Woodford, 2006; Nordmann e Mammeri, 2007).

Estas enzimas estão frequentemente associadas às cepas multirresistentes visto que carregam diversos genes de resistência em um mesmo plasmídeo. Encontram-se descritas cepas produtoras de AmpC que possuem genes de resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim e genes codificantes de outras β -lactamases (Thomson, 2001; Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009). Uma variedade de elementos genéticos têm sido implicados na mobilização do gene *ampC* em plasmídeos (Jacoby, 2009). Além disso, esta resistência tem-se disseminado com bastante rapidez dentre *Enterobacteriaceae* humanas, animais e ambientais (Pires et al., 2015).

2.3 Regulação de AmpC

A regulação de AmpC é estudada desde sua descoberta, por Jaurin e Grundstrom (1981) que descreveram a região regulatória que precede a região codificante de *ampC*. A regulação da expressão de *ampC* pode diferir entre os microrganismos Gram negativos (Schmidtke e Hanson, 2006). O mecanismo de expressão e repressão genética está associado à construção da parede celular e à possível exposição da bactéria a um β -lactâmico, e a regulação de *ampC* determina a diferença entre as β -lactamases AmpC constitutivas e induzíveis (Jacoby, 2009; Martínez-Rojas, 2009).

A indução de AmpC ocorre por meio de um sistema envolvendo ampD (uma amidase citosólica), ampG (uma permease da membrana interna), ampR (um regulador transcricional tipo Lis-R) e intermediários de peptidoglicanos que são reciclados (Figura 2) (Philippon et al., 2002; Schemidtke e Hanson, 2006; Al-Bayssari et al., 2015).

O processo pelo qual há ativação de *ampC* inicia-se com a degradação da parede bacteriana após um dano, como o causado pelo antimicrobiano, ou pelo crescimento celular bacteriano e assim as subunidades de peptidoglicano da parede são liberadas e internalizadas no citoplasma pela AmpG, uma permease transmembrana. No citoplasma, essas subunidades, 1,6-anidromuropeptídeo ligam-se à *ampR* – um gene transcricional – induzindo a expressão de *ampC* e consequentemente a síntese da enzima. Essas subunidades são clivadas pela AmpD (uma N-acetilmuramil-L-alanina amidase) em ácido 1,6-anidromurâmico e peptídeos. O peptídeo é transformado em tripeptídeo, que é reutilizado pelas enzimas da via de reciclagem da parede celular resultando na formação do precursor da parede celular, UDP-MurNac-pentapeptídeo. Quando ocorre a ligação de AmpR com UDP-MurNac-pentapeptídeo, há repressão de *ampC*. Não se tem conhecimento sobre a atividade exata de AmpE além da função em conjunto com AmpD. O operon AmpDE executa a função reguladora de AmpC pela produção de uma molécula sensorial de membrana (Schemidtke e Hanson, 2006; Jacoby, 2009; Martínez-Rojas, 2009; Guérin et al., 2015).

Em células selvagens, a produção de AmpC é expressa constitutivamente em baixos níveis devido à ligação de UDP-MurNac-pentapeptídeo à AmpR. A causa mais comum de super produção de AmpC está associada a mutações em AmpD, mas em menor escala se relata mutação em AmpR acarretando cepas com características de hiperprodução da enzima; estes fenômenos são denominados derepressão da AmpC. As bactérias mutantes podem ser fenotipicamente resistentes a cefalosporinas de espectro estendido pela hiperprodução da enzima (Schemidtke e Hanson, 2006; Nordmann e Mammeri, 2007; Jacoby, 2009).

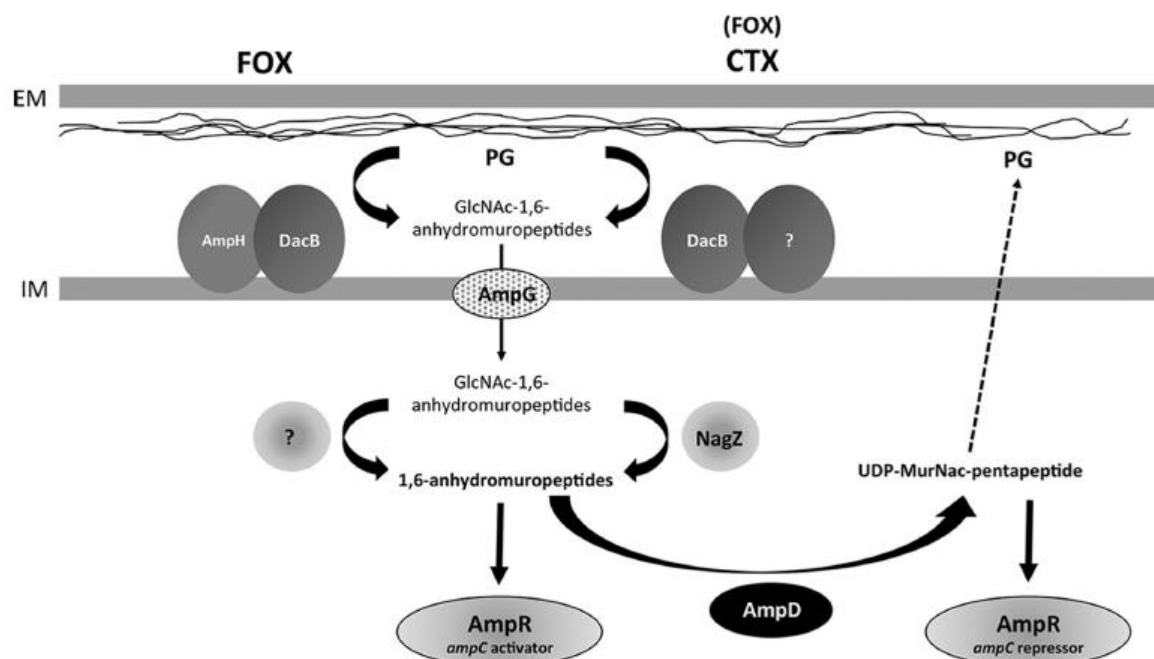


Figura 2. Modelo da indução transcricional de *ampC* pela exposição à cefoxitina ou cefotaxima, em *Enterobacter cloacae*. EM – membrana externa, IM – membrana interna, GlcNAC – N-acetilglicosamina, MurNac – ácido N-acetilmurâmico, PG – peptidoglicano, FOX – cefoxitina, CTX – cefotaxima, NagZ – codifica uma N-acetil-D-glucosaminidase. Ilustração e descrição retiradas de Guérin et al., 2015.

Muitos estudos para compreensão do mecanismo de regulação de AmpC são realizados, em especial com *Pseudomonas aeruginosa*, e vem demonstrando a ligação de outros genes e de proteínas ligantes de penicilinas (PBP) no complexo sistema de reciclagem da parede celular bacteriana (Guérin et al., 2015).

O gene *ampC* de *Escherichia coli* é normalmente expresso em baixo nível, regulado por um mecanismo de atenuação dependente da taxa de crescimento mas não por indução, uma vez que o regulador *ampR* foi perdido (Philippon et al., 2002; Schemidtk e Hanson, 2006; Al-Bayssari et al., 2015). Nesta espécie, o gene *bolA* e o gene *ftsZ* também estão envolvidos na regulação de *ampC* uma vez que atuam no momento da divisão celular (Hanson e Sanders, 1999; Santos et al., 1999; 2002).

As AmpC mediadas por plasmídeos não são induzíveis, em sua maioria. Quatro das mais de 20 pAmpC são induzíveis: DHA-1, DHA-2, ACT-1, CMY-13, pois estão ligadas ao gene *ampR*. Apesar de CFE-1 também estar ligado ao *ampR*, aparentemente não é induzível (Schemidtk e Hanson, 2006; Jacoby, 2009).

2.4 Super produção de AmpC em *Escherichia coli*

Dentre as enterobactérias, *Escherichia coli* é um natural produtor de AmpC com promotor e atenuador fracos e por isto não produz enzima em quantidade suficiente para demonstrar fenotipicamente a característica de produtor de AmpC: resistência à cefoxitina. Cepas desta espécie, com resistência fenotípica à cefoxitina, são considerados super produtores de AmpC, devido a uma das seguintes modificações: aquisição de um promotor de *Shigella* spp., mutação em promotor e/ou em atenuador, deleção do atenuador, ou por aquisição de AmpC plasmidial, como CMY (Olsson et al., 1983; Nelson e Elisha, 1999; Philippon et al., 2002; Haenni et al., 2004; Siu et al., 2003; Jorgensen et al., 2010).

As descrições de inserção ou deleção mais frequentes no promotor e atenuador de AmpC em *Escherichia coli* são nas posições: -88, -82, -42, -18, -1 e +58 (Olsson, 1983; Caroff et al., 2000; Haenni et al., 2014).

Uma única mutação é suficiente para causar alta produção da enzima, visto a alteração de C para T em -42 descrita por Olsson e colaboradores (1983) que ocasionou um promotor mais forte que o comumente existente nesta espécie. A alteração do número de pares de bases entre -42 e -18 ocasiona mudança nos boxes -35 e -10 e está ligada à alta resistência à cefoxitina bem como a mutação no atenuador, entre +17 e +37 (Olsson et al., 1983; Caroff et al., 1999; Nelson e Elisha, 1999; Siu et al., 2003; Jorgensen et al., 2010). A posição +24 em que se localiza o *hairpin* também já foi descrita como região importante para a transcrição do gene e consequentemente produção da enzima (Caroff et al., 1999; Siu et al., 2003).

Segundo Haenni e colaboradores (2004), as mutações em -32, -11 e +6 são possivelmente mais comuns em *Escherichia coli* dos filogrupos B2 e D.

A super produção de AmpC não acarreta resistência ao cefepime, isso pode ser causado pela produção de uma ESBL (β -lactamase de espectro estendido) concomitante ou de uma AmpC de espectro estendido (ESAC) (Thomson, 2001; Nasim et al., 2004; Mammeri et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

2.5 AmpC de Espectro Estendido (ESAC) – Um Novo Tipo de AmpC

Como característica desse grupo enzimático, a sensibilidade às cefalosporinas de quarta geração vem sendo bastante discutida, uma vez que estudos já identificaram CMY cujo espectro de ação é estendido. Essa enzima foi denominada ESAC (Extended-spectrum AmpC) e vem alarmando a comunidade científica e órgãos de saúde pela dificuldade de terapia em cepas produtoras destas AmpC (Pires et al., 2015).

A primeira AmpC de espectro estendido foi descrita em *Enterobacter cloacae* isolada de origem humana em 1992, no Japão, que conferia resistência também às oximiinocefalosporinas (Nukaga et al., 1995). O estudo desta cepa mostrou a duplicação de três aminoácidos responsáveis pela característica de atividade estendida da AmpC e experimentalmente demonstraram que qualquer inserção após o aminoácido Arg210 poderia ser responsável pela hidrólise estendida a outros β -lactâmicos. Em 2006, uma enzima CMY-10 foi estudada após apresentar espectro estendido, e foi visto que mutações na enzima ocasionaram mudanças conformacionais na enzima e por isso o sítio ativo tornou-se menos rígido (Kim et al., 2006). Uma cepa de *Escherichia coli* produtora de ESAC foi identificado em um rebanho bovino na França, em 2014 (Haenni et al., 2014).

Em bactérias que possuem ESAC cromossomal tem sido observada resistência à cefepime, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, e tem sido observada certa atividade hidrolítica sobre imipenem. Isolados clínicos apresentando inserções, deleções e substituições de aminoácidos na alça H-10 (R-2) foram descritas em *ampC* cromossomais e plasmidiais. Substituições ou inserções de aminoácidos na alça Ω da molécula enzimática conferem um espectro estendido à enzima, atuando também sobre cefalosporinas de terceira geração bem como substituições nas hélices H-2 e H-11 resultam em AmpC mais eficientes sobre as cefalosporinas do que suas parentais (Barnaud et al., 2001; Mammeri et al., 2004; Nordmann e Mammeri, 2007).

Pires e colaboradores (2015) descreveram o primeiro caso clínico em que uma pAmpC, CMY-2, evoluiu para uma pESAC, CMY-33 durante tratamento com cefepime. A β -lactamase CMY-33 demonstrou fenótipo semelhante ao de uma ESBL, com alta MIC

(Concentração Inibitória Mínima) para cefepime mas baixa MIC para cefoxitina e ampicilina quando comparada com CMY-2. Essa diferença pode ser explicada pela deleção de Leu293-Ala294 na hélice H-10 de CMY-33.

Novas ESAC podem surgir a partir de mutações variáveis na estrutura da enzima convencional, uma vez que ensaios laboratoriais já demonstram atividade de ESAC em enterobactérias modificadas *in vitro* (Nordmann e Mammeri, 2007).

2.6 Epidemiologia de Enterobacteriaceae Produtores de AmpC

Os membros da família Enterobacteriaceae constituem o maior e mais heterogêneo grupo de bactérias Gram negativas de importância clínica e atualmente também estão presentes nas cepas provenientes de animais e seus produtos, além de estarem presentes na água e solo como contaminantes ambientais (Am et al., 2009; Vasques et al., 2011; Ghatak et al., 2013; Liebana et al., 2013; Ferreira et al., 2014; Medhanie et al., 2014; Randall et al., 2014; Waltemyer et al., 2014; García-Cobos et al., 2015; Sanz et al., 2015).

Este grupo de bactérias é um problema crescente na assistência hospitalar devido à multirresistência observada (Zhang et al., 2013; Liebana et al., 2013; Hogardt et al., 2015). A taxa de resistência aos antimicrobianos entre enterobactérias acelerou dramaticamente nos últimos anos e atingiu escala de pandemia, devido à uma grande diversidade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos existentes (Luna et al., 2014; Mehrad et al., 2015; Russotto et al., 2015; Silva et al., 2015). A literatura relata também diversos alimentos de origem animal contaminados com estas enterobactérias, inclusive na cadeia produtiva de leite (Nóbrega et al., 2013; Mazurek et al., 2013; Bianchini et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Hoffmann et al., 2014; Randall et al., 2014; Duse et al., 2015). Nos últimos anos, novos tipos de β -lactamases têm emergido, incluindo ESBL, AmpC e metalo- β -lactamases (Maleki, 2015).

Enterobacteriaceae produtoras de AmpC vem sendo descritas em isolados nosocomiais e não nosocomiais, em todo o mundo. A disseminação deste mecanismo de resistência é devido à transferência de elementos móveis dentre as diferentes espécies de Gram negativos (Jacoby, 2009; Pires et al., 2015).

Atualmente, existem 27 pAmpC descritas sendo CMY a prevalente (Quadro 2). Esta enzima pertence ao grupo LAT-BIL-CMY, e está disseminada mundialmente, principalmente em *Escherichia coli*. As demais enzimas são pouco relatadas em Enterobacteriaceae. Dentre todos os genes plasmidiais, o mais relatado em todo o mundo é o CMY descrito em cepas humanas, animais, produtos de origem animal e ambiente, embora não haja dados na literatura referentes a *E. coli* produtoras de pAmpC em leite bovino (Philippon et al., 2002). A CMY-2 é a prevalente, no entanto mutações ocasionaram a criação de novas CMY inclusive de espectro estendido (Bret et al., 1998; Haldorsen et al., 2008; Mata et al., 2012; Pires et al., 2015).

Embora *Escherichia coli* seja naturalmente produtora de AmpC não induzível, são descritas diversas pAmpC nesta espécie. *Klebsiella* spp. não possui AmpC cromossomal mas é descrita como produtora de AmpC plasmidiais. DHA é a enzima mais descrita neste gênero, porém também foi descrita em *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. (Leiza et al., 1994; Alvarez et al., 2004; Li et al., 2008; Rayamakhi et al., 2008; Roche et al., 2008; Jones et al., 2009; Kang et al., 2009; Mata et al., 2009 e 2012; Cejas et al., 2012; Iliaguere et al., 2012; Miró et al., 2012; Voets et al., 2012; Freitas et al., 2014; Jones-Dias et al., 2014; Gharout-Sait et al., 2015; Hsieh et al., 2015; Husickova et al., 2015).

A pAmpC FOX foi encontrado em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. nos EUA, Canadá, Índia, Portugal e Espanha, sendo isoladas de amostras clínicas humanas e água

(Portugal) (Leiza et al., 1994; Alvarez et al., 2004; Simner et al., 2011; Manoharan et al., 2012; Miró et al., 2012; Amador et al., 2015). Estas cepas estão circulando em ambientes hospitalares e talvez por este motivo também tenham sido isolados na água de uma estação de tratamento em Coimbra, Portugal, que recebe água do hospital universitário da cidade (Amador et al., 2015).

Proteus mirabilis já foi descrito como espécie naturalmente produtora de AmpC, mas perdeu o gene cromossomal e atualmente estão descritas pAmpC de diferentes grupos nesta espécie, como visto na tabela 1: ACC, ACT, CIT, CMY, DHA e MIR (Leiza et al., 1994; Bret et al., 1998; Adler et al., 2008; Jones et al., 2009; Mata et al., 2009, 2011 e 2012; Miró et al., 2012; Treviño et al., 2012). As enzimas EBC e MOX não foram descritas em *Proteus* spp., mas foram encontradas noutras enterobactérias, inclusive em cepas produtoras de AmpC induzível como *Enterobacter cloacae* (Husickova et al., 2012; Manoharan et al., 2012; Wu et al., 2013).

No continente europeu, é possível encontrar todos os tipos de AmpC circulando nos diferentes ambientes: hospitalar, comunidade, animais, carnes e água (Bret et al., 1998; Mata et al., 2012; Miró et al., 2012; Treviño et al., 2012; Wu et al., 2013; Amador et al., 2015). Na América do Sul, foram descritas CMY-2, DHA-1, ACT-1 e MIR-1 em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (Pavez et al., 2008; Jones et al., 2009; Cejas et al., 2012; Egervärn et al. 2013; Botelho et al., 2015). Atualmente, mais de 30 pAmpC estão circulando entre as enterobactérias patogênicas, como pode ser constatado no quadro 2.

A disseminação destas cepas carreadoras de genes pAmpC ocorre por animais e humanos, por transmissão direta entre pessoas e animais, ou via cadeia alimentar, e é considerada uma zoonose (Liebana et al., 2006; Dierikx et al., 2013; Hammerum et al., 2014; García-Cobos et al., 2015; Wohlowend et al., 2015).

Quadro 2. Enzimas AmpC plasmidiais descritas em Enterobacteriaceae, no mundo

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Citrobacter freundii</i>	CIT	sangue	2003-2007	Taiwan	Kao et al., 2010
	CIT	indivíduos da comunidade	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
<i>Citrobacter koseri</i>	CMY-2, DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
	EBC	água	2015	Portugal	Amador et al., 2015
<i>Citrobacter werkmanii</i>	CIT	indivíduos da comunidade	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
<i>Enterobacter cloacae</i>	DHA	sangue	2003-2007	Taiwan	Kao et al., 2010
	EBC	sangue	2003-2007	Taiwan	Kao et al., 2010
	EBC	indivíduos da comunidade	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
	grupo CIT	carcaça de frangos de corte e suabe cloacal	2010	Alemanha	Reich et al., 2013
	FOX	água	2015	Portugal	Amador et al., 2015
	EBC	água	2015	Portugal	Amador et al., 2015
<i>Enterobacter sakazakii</i>	EBC	água	2015	Portugal	Amador et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	FOX, CIT	amostras clínicas (humana)	1989	EUA	Leiza et al., 1994
	CMY-1	amostras clínicas (humana)	1999	Coreia do Sul	Yong et al., 2002
	ACT-1	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004
	FOX-5	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004
	CMY-2	amostras de suínos necropsiados	1999-2006	Coreia	Rayamajhi et al., 2008
	ACC-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-4, CMY-27	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2002-2006	China, Ucrânia, México	Jones et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Taiwan, México	Jones et al., 2009
	ACT-1	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Austrália, Bulgária, Rússia, Hungária, Ucrânia, Índia, México	Jones et al., 2009
	MIR	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Índia	Jones et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (hospital e laboratório comunitário)	2002-2008	Portugal	Freitas et al., 2014
	DHA-1	amostras clínicas (hospital e laboratório comunitário)	2002-2008	Portugal	Freitas et al., 2014
	CMY-2, CMY-7	amostras clínicas (humana)	2003-2005	Noruega	Haldorsen et al., 2008
	CMY-2, DHA-1	amostras clínicas (humana)	2003-2005	China	Li et al., 2008
	CMY-2, DHA-1, CMY-7	amostras clínicas (humana)	2003-2007	Noruega	Naseer et al., 2009
	ACC-1	amostras clínicas (humana)	2004, 2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2004-2008	Portugal	Jones-Dias et al., 2014
	CMY-40	amostras clínicas (humana)	2005	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-4	amostras clínicas (humana)	2005, 2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (hospital infantil)	2005-2006	China	Ding et al., 2008
	DHA-1	amostras clínicas (hospital infantil)	2005-2006	China	Ding et al., 2008
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2005-2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-611, CMY-11, MOX-cmy-9	amostras clínicas (humana)	2005-2009	Alemanha	Wu et al., 2013
	CMY-11, MOX-cmy-9	amostras clínicas (humana)	2005-2009	Reino Unido	Wu et al., 2013
	CMY-611, MOX-cmy-9	amostras clínicas (humana)	2005-2009	Holanda	Wu et al., 2013
CMY-611, CMY-11	amostras de frango	2005-2009	Alemanha	Wu et al., 2013	

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	CMY-611, CMY-11	amostras rebanho bovino	2005-2009	Reino Unido, Holanda	Wu et al., 2013
	MOX-cmy-9	amostras rebanho bovino	2005-2009	Alemanha	Wu et al., 2013
	CMY-27	amostras clínicas (humana)	2006	Espanha	Mata et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Suíça	Adler et al., 2008
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Suíça	Adler et al., 2008
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2007	Brasil	Pavez et al., 2008
	DHA-1, CMY-2, CMY-10, CMY-11	amostras clínicas (humana)	2007	Coreia	Song et al., 2009
	CIT-FOX	amostras clínicas (humana)	2007-2008	Índia	Manoharan et al., 2012
	CMY-2, FOX-5	amostras clínicas (humana)	2007-2009	Canadá	Samner et al., 2011
	CMY-2	amostras clínicas de cães	2008-2010	Europa	Bogaerts et al., 2015
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Bélgica	Bogaerts et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	MIR	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	CMY-2, DHA-1, ACC-1, FOX-3, FOX-8, CMY-4, CMY-7, CMY-27, CMY-43, CMY-48, CMY-54, CMY-55, CMY-57, DHA-6	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
	ACT	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Argentina	Cejas et al., 2012
	CMY-2	vitelos	2009	Holanda	Hordijk et al., 2013
	CMY-2	frangos de corte e manipuladores da granja	2009	Holanda	Dierikx et al., 2013
	CMY-2, ACT, MIR	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2013
DHA-23	amostras clínicas (humana)	2009-2012	Taiwan	Hsieh et al., 2015	

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	CIT	indivíduos da comunidade	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
	CMY-2	carne de frango	2010	Suíça	Börjesson et al., 2013
	CMY-2	carne de frango	2010	Holanda	Voets et al., 2013
	CMY-2	carne suína	2010-2011	Europa	Egervärn et al., 2013
	CMY-2	carne de frango	2010-2011	Argentina e Chile	Egervärn et al., 2013
	grupo CIT	carcaça de frangos de corte e suabe cloacal	2010	Alemanha	Reich et al., 2013
	CMY-2	carne de frango	2010-2011	Brasil	Botelho et al., 2015
	CMY-2, pAmpC	fezes de cães e gatos	2011-2012	Holanda	Hordijk et al., 2013
	CMY-2	água (residual)	2011-2012	Tunísia	Said et al., 2016
	CMY-2	frangos de corte e carne de frango	2011-2014	Noruega	Manoharan et al., 2012
	CMY-2	frangos de corte e carne de frango	2011-2014	Noruega	Mo et al., 2016
	CMY-42	isolado clínico	2012	China	Feng et al., 2015
	CMY-2	gado, suíno, galinha, frango, peru	2012	Polônia	Lalak et al., 2016
	grupo CIT	carne de frango, suína e bovina	2012-2014	Vietnã	Nguyen et al., 2016
	DHA	carne de frango e de pescado	2012-2014	Vietnã	Nguyen et al., 2016
	CMY-2	fezes frescas de corvos	2013	Áustria	Loncaric et al., 2013
	CMY-2	suíno	2013	Alemanha	García-Cobos et al., 2015
	CMY-2	galinha poedeira, frango de corte, galinha	-	Portugal	Jones-Dias et al., 2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMY-1	amostra clínica (ferida infeccionada)	1989	Coreia do Sul	Bauernfeind et al., 1989
	FOX	amostras clínicas (humana)	1989	EUA	Leiza et al., 1994
	CMY-2	amostra clínica (pielonefrite)	1990	Grécia	Bauernfeind et al., 1996
	ACT-1	amostras clínicas (humana)	1994	EUA	Bradford et al., 1997
	ACT-1	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004
	FOX-5	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMY-1	amostras clínicas (humana)	1999	Coreia do Sul	Yong et al., 2002
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1994-1995	EUA	Alvarez et al., 2004
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1995-2005	Coreia	Kang et al., 2009
	CMY-2	amostras de suínos necropsiados	1999-2006	Coreia	Rayamajhi et al., 2008
	DHA-1	amostras de suínos necropsiados	1999-2006	Coreia	Rayamajhi et al., 2008
	ACC-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-25	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2001-2005	Espanha	Mata et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Coreia, Taiwan, Romênia, Ucrânia, EUA	Jones et al., 2009
	ACT-1	amostras clínicas (humana)	2002-2006	África do Sul	Jones et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (hospital e laboratório comunitário)	2002-2008	Portugal	Freitas et al., 2014
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2003-2005	China	Li et al., 2008
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2004	China	Li et al., 2008
	ACC-1	amostras clínicas (humana)	2005	Espanha	Mata et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (hospital infantil)	2005-2006	China	Ding et al., 2008
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2005-2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Suíça	Adler et al., 2008
	ACC-1	amostras clínicas (humana)	2005-2007	Irlanda	Roche et al., 2008
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2005-2007	Irlanda	Roche et al., 2008
CMY-4	pacientes hospitalizados e não hospitalizados	2005-2010	Argélia	Gharout-Sait et al., 2015	
DHA-1	pacientes hospitalizados e não hospitalizados	2005-2010	Argélia	Gharout-Sait et al., 2015	

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMY-25	amostras clínicas (humana)	2006	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-31	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Suíça	Adler et al., 2008
	EBC	amostras clínicas (humana)	2007-2008	Índia	Manoharan et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2007-2009	França	Illiaquere et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas de cães	2008-2010	Europa	Bogaerts et al., 2015
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Argentina	Cejas et al., 2012
	MIR	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	DHA-1, CMY-2, ACC-1, CMY-56, CMY-96	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	DHA-23	amostras clínicas (humana)	2009-2012	Taiwan	Hsieh et al., 2015
	AmpC	amostras clínicas (humana)	2013	Irã	Azimi et al., 2015
	CMH-2	amostras clínicas (humana, urina)	2013	Índia	Ingті et al., 2017
<i>Klebsiella oxytoca</i>	FOX	amostras clínicas (humana)	1989	EUA	Leiza et al., 1994
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2003	China	Li et al., 2008
	DHA-1	amostras clínicas (hospital e laboratório comunitário)	2002-2008	Portugal	Freitas et al., 2014
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2004-2008	Portugal	Jones-Dias et al., 2014
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2, DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	DHA	indivíduos hospitalizados	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
<i>Morganella morganii</i>	DHA	indivíduos da comunidade	2010	República Tcheca	Husickova et al., 2012
<i>Proteus mirabilis</i>	CIT , DHA	amostras clínicas (humana)	1989	EUA	Leiza et al., 1994

ESPÉCIE ISOLADA	ENZIMA	ISOLAMENTO	ORIGEM	PAÍS	REFERÊNCIA
<i>Proteus mirabilis</i>	CMY-3	amostra urina humana	-	França	Bret et al., 1998
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2000, 2004-2007	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2000-2007	Espanha	Mata et al., 2011
	DHA	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Índia, Romênia	Jones et al., 2009
	ACT-1, MIR-1	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Letônia, Brasil	Jones et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2002-2006	Romênia	Jones et al., 2009
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2006	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2006-2007	Suíça	Adler et al., 2008
	LAT (1-4), CMY (2-7), BIL-1	amostras clínicas (humana)	2006-2009	Espanha	Trevino et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas de cães	2008-2010	Europa	Bogaerts et al., 2015
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Argentina	Cejas et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Holanda	Voets et al., 2012
	CMY-2, ACC-1, DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	CMY-99	urina de indivíduos hospitalizados	2011-2012	Bulgária	Schneider et al., 2013
	CMY-2	fezes de gatos	2011-2012	Holanda	Hordijk et al., 2013
	grupo CIT	carcaça de frangos de corte e suabe cloacal	2010	Alemanha	Reich et al., 2013
	<i>Proteus penneri</i>	CMY-2	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha
<i>Salmonella enterica</i>	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999, 2006	Espanha	Mata et al., 2009
	CMY-2	amostras clínicas (humana)	1999-2007	Espanha	Mata et al., 2012
	DHA-1	amostras clínicas (humana)	2009	Espanha	Miró et al., 2012
<i>Serratia liquefaciens</i>	EBC	água	2015	Portugal	Amador et al., 2015

2.7 Fatores de Risco que Contribuem para a Disseminação de Enterobacteriaceae Produtoras de AmpC e Medidas de Controle

A resistência das enterobactérias aos agentes antimicrobianos vem crescendo em cepas de origem animal, e as cefalosporinas são comumente prescritas para tratamento de infecções entéricas em animais de produção e de companhia (Rayamajhi et al., 2008). Outra prática bastante comum é o uso de antimicrobianos em subdoses adicionados à ração animal como fatores de crescimento na produção de bovinos, suínos e frangos (Kim e Wei, 2007; Herrero-Fresno et al., 2015).

Muitos autores afirmam que a utilização de antimicrobianos como fatores de crescimento na produção animal e o uso frequente de antimicrobianos no tratamento de infecções em animais são responsáveis pela seleção de bactérias humanas e animais resistentes a múltiplos antimicrobianos. Além disso, bactérias resistentes oriundas de animais podem ser transmitidas aos humanos via cadeia alimentar, sendo consideradas por isso zoonoses (Liebana et al., 2006; Kim e Wei, 2007; Dias et al., 2008; Dierikx et al., 2013; Liebana et al., 2013; Zhang et al., 2013; Bortolaia et al., 2014; García-Cobos et al., 2015).

Em contrapartida, Borolaia e colaboradores (2014) estudaram isolados provenientes de cães, de gatos e de humanos e encontraram alta heterogeneidade entre as cepas sugerindo uma limitada ligação entre isolados de origem animal e humana. No mesmo ano, Albrechtova e colaboradores (2014) relataram a presença de genes de resistência em bactérias encontradas em todos os ecossistemas incluindo aqueles em que não há uso de antimicrobianos. O estudo de Cottell e colaboradores (2014) também sugere que o uso de antimicrobianos não influencia a disseminação de plasmídeos contendo genes de resistência aos antimicrobianos.

Contudo, são necessários mais estudos em enterobactérias produtoras de β -lactamases oriundas de animais de produção, para que se possa afirmar se estas são patógenos em potencial para humanos, ou se os animais de produção são reservatórios de bactérias produtoras destas enzimas (Rayamajhi et al., 2008; García-Cobos et al., 2015).

Um fator de risco importante neste contexto é a transmissão destas cepas em hospitais e na comunidade, uma forte evidência da colonização intestinal humana por estes microorganismos resistentes, servindo como reservatório. Além disso, a importação de carnes também está relacionada à disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos (Liebana et al., 2013; Reich et al., 2013; Voets et al., 2013; Wu et al., 2013). O íntimo contato entre homem e animal também possibilita a transmissão destas bactérias: uma cepa produtora de CMY-2 foi identificado em uma criança de 12 anos, filha de um fazendeiro proprietário de um rebanho infectado pela mesma cepa (Jacoby, 2009).

Estes trabalhos salientam a importância da implementação de diagnóstico específico para enterobactérias produtoras de AmpC, métodos de monitoramento, assim como métodos de controle de enterobactérias produtoras de AmpC oriundas de animais de produção e em hospitais veterinários (Rayamajhi et al., 2008; Liebana et al., 2013; Wohlwend et al., 2015).

2.8 Quimioterapia antimicrobiana para Infecções Causadas por Enterobacteriaceae Produtores de AmpC

Em 1986, observou-se a emergência de enterobactérias resistentes em infecções causadas por estas bactérias devido ao uso de cefalosporinas de terceira geração (Honoré et al., 1986). Com a evolução dos mecanismos de resistência, as terapias antimicrobianas precisaram ser modificadas ou ajustadas, e no caso de enterobactérias produtoras de AmpC isso deveu-se às mudanças estruturais desta enzima como o aumento de seu espectro de ação

(ESAC) (Nordmann e Mammeri, 2007). Atualmente, nos deparamos com o complexo quadro de multirresistência antimicrobiana pelas mais diversas espécies bacterianas apesar da notícia declarada em 1969, por um órgão estadunidense, de que a problemática sobre as doenças infecciosas estaria resolvida após o advento dos antimicrobianos (Rasko e Sperandio, 2010).

Cepas produtoras de AmpC normalmente têm apresentado resistência a múltiplos antimicrobianos, não sendo possível a administração de antimicrobianos comumente indicados no tratamento de infecções por enterobactérias e levando ao aumento da mortalidade (Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009; Martínez-Rojas, 2009). Muitas bactérias multirresistentes produzem múltiplas β -lactamases, incluindo a combinação de ESBL e carbapenemases, bem como outros mecanismos independentes de enzimas como é o caso de alterações em porinas e bomba de efluxo (Marsik e Nambiar, 2011). A utilização de antimicrobianos sem estudo prévio do isolado preocupa pelo fato de ser possível o desenvolvimento de multirresistência e de ocasionar falha terapêutica em casos severos de infecção (Thomson, 2001; Martínez-Rojas, 2009).

O número de agentes antimicrobianos seguramente efetivos contra essas cepas bacterianas é muito limitado. O cefepime é um fraco indutor de AmpC e até alguns anos este antimicrobiano era uma escolha terapêutica na ausência da produção de ESBL. No entanto, com a produção de ESAC por algumas cepas não se pode assegurar um tratamento seguro com esta cefalosporina de quarta geração (Marsik e Nambiar, 2011; Pires et al., 2015).

Segundo Jacoby (2009), amdinocilina e temocilina (derivado da 6- α -metoxicarilina) têm tido bons resultados *in vitro* e este composto pode ser utilizado em infecções causadas por bactérias produtoras de AmpC cromossomal e plasmidial. No Brasil, no entanto, estes antimicrobianos não são comercializados. Em cepas produtoras de AmpC pode-se fazer uso de carbapenemas e fluoroquinolonas, mas esta escolha deve ser baseada em avaliação de suscetibilidade do isolado a estes agentes. A piperacilina e ticarcilina são recomendadas em casos de enterobactérias produtoras de ESAC porém pode ocorrer falha terapêutica quando se tratar de cepas super produtoras de AmpC (Nordmann e Mammeri, 2007).

Na Nigéria, isolou-se *Klebsiella pneumoniae* de amostra clínica coproduzindo ESBL, AmpC e carbapenemase. Esta cepa também foi resistente à colistina, antimicrobiano de última escolha para tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (Yusuf et al., 2015). Há relatos de enterobactérias resistentes à colistina em todo o mundo e oriundas de diferentes tipos de infecção e disseminadas dentre animais de produção e seus produtos (Gaspar et al., 2015; Liu et al., 2015; Fernandes et al., 2016; McGann et al., 2016; Suzuki et al., 2016). Este fato revela mais um problema do ponto de vista da saúde pública uma vez que a disseminação desta resistência vem sendo apontada como consequência do uso de aditivos na alimentação de animais de produção (Amador et al., 2015).

Os inibidores de AmpC não são utilizados comercialmente como os inibidores ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, mas alguns estudos já apontam para testes de eficácia dos compostos derivados do ácido borônico como potenciais fármacos inibidores enzimáticos (Yang et al., 2003). Futuramente, estes podem ser algumas opções no tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de AmpC.

Recentemente, descobriu-se uma nova substância com atividade antimicrobiana: o teixobactin. Outros grupos de pesquisa conseguiram sintetizar moléculas análogas e também observou-se atividade biológica contra Gram positivos e Gram negativos. O uso deste antimicrobiano, quando disponível para o uso terapêutico, auxiliará no tratamento das infecções causadas por bactérias multidroga resistentes e ainda diminuirá as chances de desenvolvimento de resistência durante o tratamento (Homma et al., 2016; Jing et al., 2016; Ling et al., 2015; Parmar et al., 2016).

A terapia antivirulência pode ser uma opção visto que algumas moléculas podem ser utilizadas como inibidoras de *quorum sensing*, de adesinas, da ligação da toxina ao receptor hospedeiro, de sistemas secretórios e até mesmo da expressão gênica de fatores de virulência (Rasko e Sperandio, 2010; Schuster et al., 2013). A segurança dessas novas terapias ainda precisa ser bem estudada para evitar interação com a microbiota do indivíduo, além de que deve ser mantido um controle e vigilância sobre o uso desses agentes a fim de evitar pressão sobre as bactérias, levando ao desenvolvimento de novos mecanismos de virulência (Clatworthy et al., 2007; Rasko e Sperandio, 2010; Schuster et al., 2013). O uso concomitante de antimicrobianos e drogas antivirulência também pode ser feito, assegurando uma melhor eficácia do tratamento (Clatworthy et al., 2007; Schuster et al., 2013).

Até que isso se torne uma realidade prática, a prescrição de antimicrobianos não deve ser feita sem a realização de um estudo aprofundado do isolado a fim de permitir uma melhor escolha de antimicrobiano e, assim, possibilitar um tratamento eficaz visto as individualidades encontradas nas cepas de Enterobacteriaceae clínicas e ambientais.

2.9 Métodos de Detecção de AmpC

É muito importante diferenciar a produção de AmpC de outras enzimas bem como de outros mecanismos de resistência, como alteração em porinas ou bombas de efluxo. AmpC tem sido descrita em todo o mundo porém em menor frequência que outras β -lactamases, por exemplo as carbapenemases.

Poucos relatos de AmpC em enterobactérias pode estar relacionado à dificuldade na detecção desta enzima, embora em estudo realizado por Jacoby e colaboradores (1995), pAmpC foi mais detectada do que TEM, β -lactamase mais comum em Enterobacteriaceae em 20 hospitais dos Estados Unidos (Barlow et al., 2002). A ausência de métodos preconizados nos manuais internacionais dificulta a identificação da enzima (CLSI, EUCAST, BrCAST) e assim, muitos autores realizam técnicas fenotípicas individuais para detecção de AmpC (Yong et al., 2002; Thomson, 2001; Jacoby, 2009; Martínez-Rojas, 2009). No aspecto genotípico, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é largamente difundida e utilizada para detectar o gene AmpC e os subgrupos enzimáticos: DHA, CIT, CMY, FOX e outras (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Shahid et al., 2004; D'Andrea et al., 2006).

A suscetibilidade do isolado às cefamicinas (cefotitina e cefotetan) é o teste de triagem para suspeita da produção de β -lactamase tipo AmpC e a observação da resistência do isolado aos inibidores de β -lactamase também é um importante dado (Thomson, 2001). Técnicas de avaliação do sinergismo entre o substrato e um inibidor seletivo em diluição em caldo, difusão em ágar ou sistemas comerciais são outras metodologias utilizadas. O sistema mais confiável para detectar a habilidade de produção de AmpC é a amplificação do gene por PCR, porém este método não está disponível em todos os laboratórios clínicos de rotina, dificultando a notificação de isolados potencialmente produtores da enzima (Nordmann e Mammori, 2007; Marsik and Nambiar, 2011). O PCR multiplex também vem sendo usado para detectar ao mesmo tempo diferentes genes que codificam resistência aos antimicrobianos (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Dallene et al., 2010).

Outras técnicas eficientes na detecção da enzima vem sendo relatadas, como ELISA para detecção da enzima a partir da ligação desta com antígenos específicos e como MALDI TOF-MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz) que pode ser utilizada na detecção dos fragmentos do antimicrobiano degradado ou ainda usado como uma técnica complementar, apesar de não ser aconselhável em caso de detecção de AmpC em *Proteus mirabilis* (Hujer et al., 2002; Papagiannitsis et al., 2014).

A detecção da enzima pode ser feita através da técnica de extração enzimática tridimensional e vem sendo utilizada há muitos anos para confirmação deste mecanismo de resistência, embora também não seja reconhecida pelos manuais internacionais de padronização de técnicas laboratoriais (Sobia et al., 2011). Esta técnica foi comparada a um meio específico para detecção de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de AmpC: o ágar cefoxitina (CAM – cefoxitin-agar medium). Este método, proposto por Nasim e colaboradores (2004), é realizado adicionando cefoxitina em diferentes concentrações ao ágar Müller Hinton, onde é estriada a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e os extratos das cepas são inoculados nas placas para avaliação da inativação do antimicrobiano pelo extrato e consequente crescimento da cepa padrão. Um terceiro método utilizando extrato enzimático é a focagem isoelétrica, pela qual é possível identificar as enzimas presentes pelo seu ponto isoelétrico (pI) (Bauernfeind et al., 1996; Power et al., 2006; Kim e Wei, 2007; Haldorsen et al., 2008; Rodríguez et al., 2009).

A detecção de AmpC plasmidial em bactérias naturalmente produtoras desta enzima é mais difícil, pois, a expressão cromossomal não é necessária neste caso. Esta diferenciação de AmpC plasmidial e cromossomal está além das capacidades de detecção da maioria dos laboratórios. Não existe teste fenotípico para distinguir dentre as AmpC plasmidiais. A técnica considerada “padrão ouro” para detectar AmpC plasmidial é através de PCR multiplex (Jacoby, 2009).

Seguindo a mesma idéia de análise do Teste de Hodge modificado para detecção de carbapenemase, descrito pelo CLSI, Yong e colaboradores (2002) substituíram o disco de imipenem pelo disco de cefoxitina – o marcador de produção de AmpC. Esta técnica foi descrita para detectar a produção de CMY-1, devendo ser ajustada para detecção de outras AmpC.

Outra técnica que pode ser empregada para detecção da AmpC é a MIC através de *E-test*, que se baseia na utilização de uma fita contendo de um lado cefotetan ou cefoxitina e do outro lado o mesmo composto combinado com cloxacilina (Jacoby, 2009; Polsfuss et al., 2011).

A confirmação fenotípica deste mecanismo de resistência pode ser feito utilizando inibidores de AmpC: ácido borônico e seus derivados, ou cloxacilina (Yang et al., 2003; Coudron, 2005; Jiang et al., 2006; Jacoby, 2009; Rodríguez-Martínez et al., 2009; Tondi et al., 2010; Peter-Getzlaff et al., 2011; Su et al., 2012). O sinergismo de cloxacilina/oxacilina e ácido borônico observado na presença de AmpC tipo selvagem também pode ser visto em ESAC (Nordmann e Mammeri, 2007). Ruppé e colaboradores (2006) descreveram a técnica de duplo sinergismo utilizando o disco de cefoxitina próximo ao de ceftazidima ou de cefotaxima, e assim confirmar a produção da enzima AmpC pela cepa.

Segundo Thomson (2001), é possível diferenciar a produção de AmpC da perda de porinas pelo teste enzimático tridimensional, no qual é utilizado um extrato contendo as enzimas produzidas pela cepa. Black e colaboradores (2005) também descrevem uma técnica utilizando um disco de EDTA próximo ao disco de cefoxitina para confirmação da produção de AmpC e não a perda de porinas. Isto pode ser observado porque o EDTA aumenta a permeabilidade da parede bacteriana e libera as enzimas para atuarem sobre o antimicrobiano, cefoxitina. As cepas suspeitas de produzirem ESAC devem ser confirmadas para esta enzima, excluindo-se a possibilidade de produção de outras β -lactamases e também associação deste mecanismo de resistência à diminuição de porinas de membrana (Nordmann e Mammeri, 2007).

Outras técnicas ainda podem ser descritas e sugeridas na tentativa de auxiliar na detecção e confirmação de AmpC em isolados clínicos e de interesse na saúde pública.

3 OBJETIVO

Caracterizar a enzima AmpC em Enterobacteriaceae provenientes de amostras clínicas humanas de Portugal e de rebanhos leiteiros do Brasil.

3.1 Objetivos Específicos

- Analisar, fenotipicamente, por diferentes metodologias, a produção de AmpC nestas cepas;
- Analisar a produção de AmpC a partir da caracterização do ponto isoelétrico enzimático;
- Analisar, genotipicamente, a produção de AmpC bem como caracterizar o grupo pertencente (ACC, CIT, CMY, DHA, EBC, FOX, MOX);
- Analisar a presença de AmpC plasmidial, por conjugação;
- Analisar, por sequenciamento, mutações que ocasionam aumento do espectro de atividade da enzima e superexpressão de AmpC.

4 METODOLOGIA

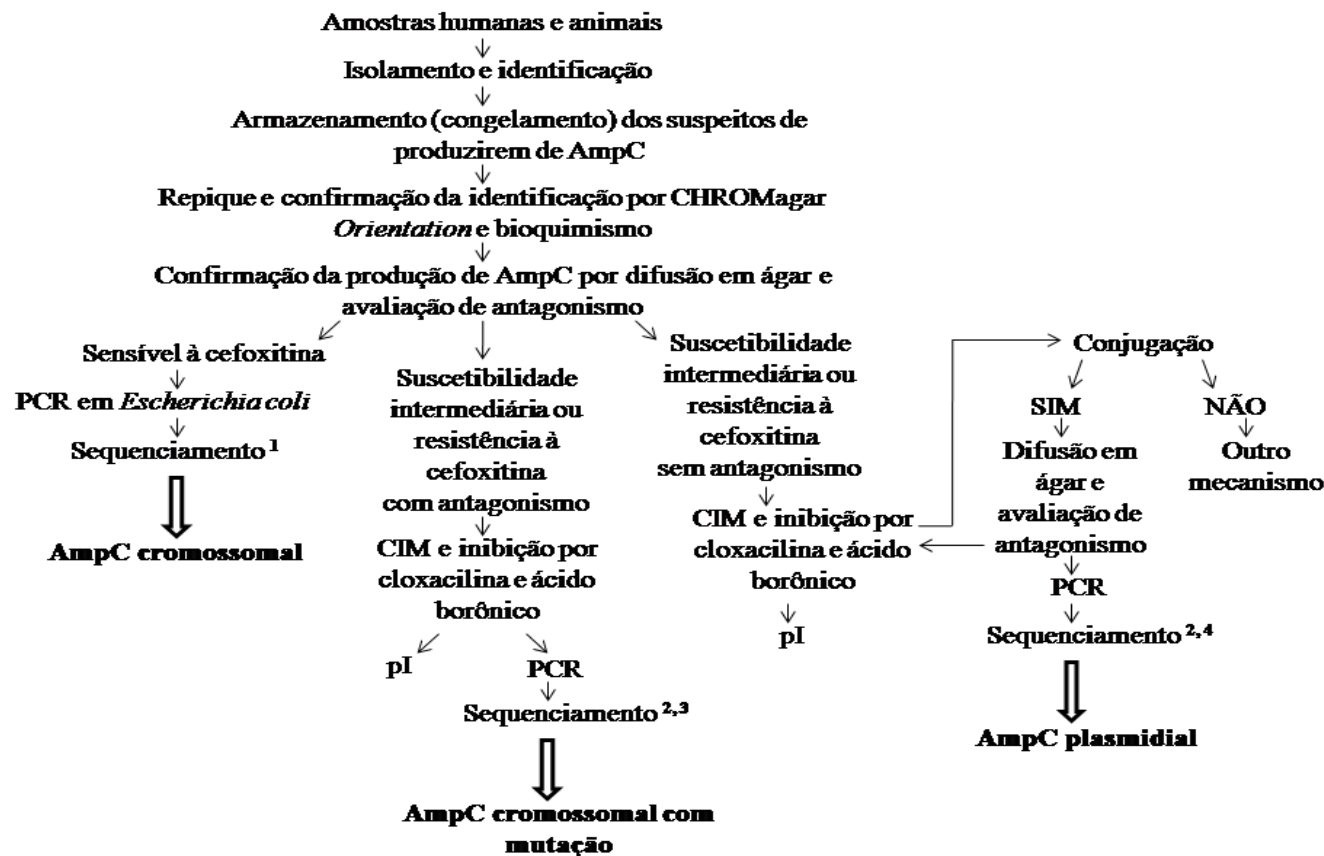


Figura 3. Fluxograma resumido da metodologia adotada para detecção e confirmação de AmpC. Legenda: 1- Sequenciamento para confirmação do gene AmpC. O pI não foi determinado devido ao uso de cefoxitina para obtenção do extrato bruto. 2- Sequenciamento para detecção de pontos de mutação no gene transcrito, compatíveis com ESAC. 3- Sequenciamento para detecção de pontos de mutação no promotor do gene AmpC identificando super produtores de AmpC. 4- Sequenciamento para determinação do grupo AmpC.

4.1 Amostragem

A amostragem de enterobactérias utilizadas neste estudo é composta por 18 enterobactérias isoladas de amostras clínicas humanas de Portugal, 20 enterobactérias isoladas de leite bovino mastítico do Rio de Janeiro e 238 cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de rebanho bovino brasileiro.

4.1.1 Cepas estudadas na FFUP: enterobactérias isoladas de casos clínicos humanos de Portugal e enterobactérias isoladas de leite mastítico bovino brasileiro

Foram utilizadas 18 enterobactérias isoladas de diferentes amostras clínicas coletadas em um hospital na região norte de Portugal. Estas cepas foram selecionadas aleatoriamente de uma lista de 116 cepas previamente identificadas e classificadas como produtoras de AmpC por testes fenotípicos. A descrição das cepas produtoras de AmpC está descrita no quadro 3.

Quadro 3. Características das enterobactérias provenientes de amostras clínicas humanas

Cepa	Amostra	Espécie	Enzima produzida
FFUP1	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP2	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP3	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP4	urina	<i>Enterobacter agglomerans</i>	AmpC
FFUP5	pus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP6	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP7	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP8	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP9	urina	<i>Escherichia coli</i>	AmpC
FFUP10	catater	<i>Proteus mirabilis</i>	AmpC
FFUP11	urina	<i>Escherichia coli</i>	AmpC
FFUP12	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP13	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP14	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP15	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP16	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP17	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC
FFUP18	urina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AmpC

Após congelamento a -80°C as cepas foram repicadas em ágar infusão de coração e cérebro (ABHI) (Liofilchem) e incubados a 35°C por 24h. Após esse período, foram repicados em ágar MacConkey (AMC) (Liofilchem) e incubados em mesmas condições para posterior confirmação fenotípica das características da colônia. A partir desse crescimento, as cepas

foram inoculadas em caldo tripticase de soja (TSB) (Liofilchem) para utilização na experimentação (Gonçalves, 2013).

Selecionou-se também 20 enterobactérias, suspeitas de produção de AmpC, provenientes de fazendas da região Sul Fluminense, do Rio de Janeiro (Figura 4) (Santiago, 2013). Estas cepas foram enviadas resfriadas para a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), Portugal, sendo submetidos aos testes realizados e padronizados sob orientação da professora Dra. Helena Neto Ferreira. As cepas foram previamente reativadas em ABHI (Merck) e em seguida isoladas em AMC (HiMedia) para posterior identificação e análise da produção de AmpC.

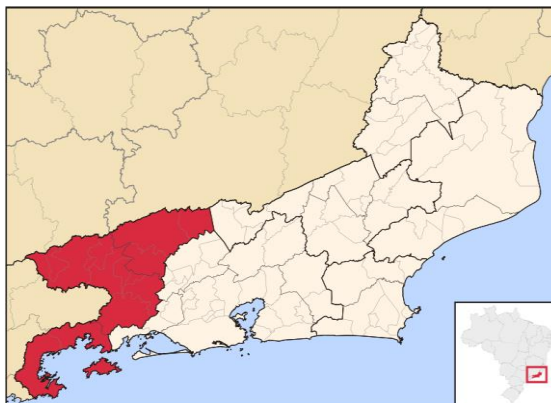


Figura 4. Mapa da região Sul Fluminense do estado do Rio de Janeiro. A região é composta pelos municípios: Angra dos Reis, Barra do Piraí, Barra Mansa, Itatiaia, Paraty, Pinheiral, Piraí, Porto Real, Quatis, Resende, Rio Claro, Rio das Flores, Valença e Volta Redonda. Fonte: Google.

4.1.2 Cepas estudadas na UFRRJ: *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico e de fezes de rebanhos bovinos leiteiros do Brasil

Foram utilizadas 53 *Escherichia coli* previamente identificadas provenientes de leite bovino mastítico das regiões: Sul Fluminense (Figura 4), no período de 2009 a 2011 (Santiago, 2013), em Barra do Piraí nos anos de 2014 e 2015 (Figura 5-a), e em nove cidades no norte gaúcho: Aratiba, Centenário, Erechim, Gaurama, Getúlio Vargas, Ipiranga do Sul, Vila Langaro, Sertão, Santa Cecília do Sul, em 2015 (Figura 5-b). Provenientes de fezes foram estudados 185 cepas de *E. coli* de fazendas leiteiras de Barra do Piraí (Figura 5-a) e região rural de Sinop, Mato Grosso (Figura 5-c).

Todas as cepas foram congeladas em caldo BHI (Merck) com glicerol (15%) a -20°C, e foram reativadas em ágar BHI (Merck) e posteriormente confirmadas suas características coloniais em ágar seletivo Mac Conkey (HiMedia) para serem utilizadas neste estudo.

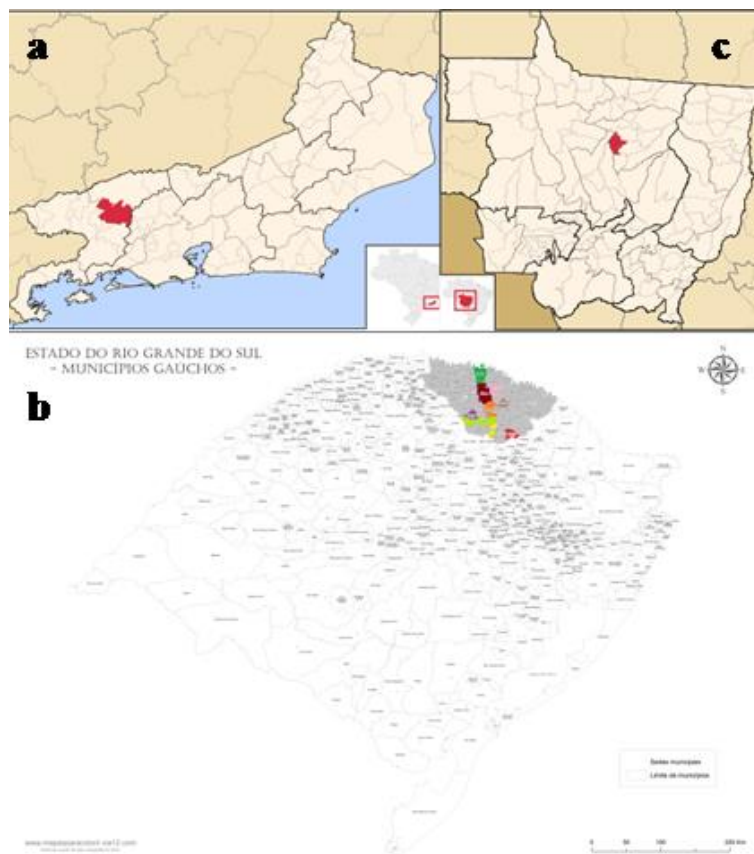


Figura 5. Mapas das regiões onde foram coletadas as amostras de leite e fezes para o estudo. a- Mapa do Rio de Janeiro: em destaque a cidade de Barra do Piraí onde coletou-se leite e fezes de rebanho bovino mastítico. b- Mapa do Rio Grande do Sul, em destaque as nove cidades ao norte do estado onde foram realizadas as coletas de leite mastítico bovino. c- Mapa do estado de Mato Grosso: em destaque a cidade de Sinop onde foram coletadas as amostras de fezes de rebanho bovino leiteiro. Fonte: Google.

4.2 Cepas Controle

Como padrão de comparação e de confirmação para os meios de cultura, testes fenotípicos, focagem isoeétrica, conjugação e PCR realizados neste estudo fez-se necessário a utilização das cepas controle:

- *Escherichia coli* CMY-2 – produtora da enzima CMY-2 foi gentilmente cedida pelo pesquisador Andrade (Andrade et al., 2015);
- *Escherichia coli* NCTC 13451 – cepa padrão – produtora de OXA-1, TEM-1 e CTX-M-15;
- *Escherichia coli* ATCC 25922 – cepa padrão – não produtora de β -lactamases;
- *Escherichia coli* HB101 – cepa padrão – não fermentadora de lactose, resistente à estreptomicina e azida, sensível aos β -lactâmicos;
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 – cepa padrão – produtora de SHV, controle para ESBL.

4.3 Confirmação da Identificação das Cepas

4.3.1 CHROMagar *orientation*

As cepas de enterobactérias humanas e animais utilizados durante o treinamento e desenvolvimento das técnicas na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP) foram repicadas em CHROMagar *orientation* (CHROMagar) para confirmação de espécie e após incubação por 24h a 35°C, pôde-se classificar os isolados pela aparência típica da colônia crescida no meio:

- Colônia rosa ou avermelhada – *Escherichia coli*
- Colônia azul turquesa – *Enterococcus* spp.
- Colônia azul metálica – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*
- Colônia amarela com halo marrom – *Proteus* spp.
- Colônia cremosa e translúcida – *Pseudomonas* spp.
- Colônia branca – *Stenotrophomonas* spp.

4.3.2 Identificação bioquímica

Para as cepas de enterobactérias enviadas à FFUP, após estriamento em ágar Mac Conkey, foi realizada a confirmação por CHROMagar *orientation* e por kit bioquímico ID32GN(Biomérieux) (Figura 6), seguindo as orientações do fabricante.

A identificação bioquímica dos isolados de *Escherichia coli* utilizados para pesquisa de AmpC na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) foi realizada segundo Koneman e colaboradores (2012). Para a realização deste trabalho, as cepas foram reativadas, não passando novamente por identificação apenas confirmação de características fenotípicas em ágar Mc Conkey e EMB.



Figura 6. Identificação bioquímica de enterobactérias pelo kit ID32GN (Biomérieux). Fonte: acervo pessoal.

4.4 Confirmação Fenotípica de β -lactamase AmpC

4.4.1 Difusão em ágar e avaliação de antagonismo

O teste de difusão em ágar Müller Hinton (AMH) (Liofilchem) foi efetuado segundo a metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* humano e veterinário (CLSI, 2013; 2014), utilizando-se os antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos (Oxoid; Sensidisc) a fim de confirmar a produção de β -lactamase AmpC, como descritos no quadro abaixo (quadro 4).

Quadro 4. Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo o CLSI (2013; 2014)

Antibióticos	µg	Resistente	Intermediário	SDD	Sensível
Amox+Ác.cla ^{1/2}	20/10	≤13	14-17	-	≥18
Amoxicilina ³	10	≤13	14-16	-	≥17
Aztreonam ¹	30	≤17	18-20	-	≥21
Cefepime ¹	30	≤18	-	19-24	≥25
Cefoxitina ¹	30	≤14	15-17	-	≥18
Ceftazidima ¹	30	≤17	18-20	-	≥21
Cefotaxima ¹	30	≤22	23-25	-	≥26
Imipenem ^{1/2}	10	≤19	20-22	-	≥23

Legenda: 1- CLSI 2014; 2- CLSI Vet 2013; 3- parâmetros segundo tabela do fabricante do antimicrobiano utilizado. SDD – Susceptible-Dose Dependent.

A leitura interpretativa do teste foi realizada a fim de sugerir a produção de β-lactamases pela cepa avaliada de acordo com a localização dos discos de β-lactâmicos no ágar (Figura 7) (Gonçalves, 2008). A formação dos halos em torno dos discos de antimicrobianos é influenciada pela proximidade destes com agentes indutores ou inibidores do mecanismo de resistência. Dessa forma, foi avaliado o antagonismo entre os discos de cefoxitina, ceftazidima e cefotaxima, e entre imipenem e cefepime, que são as características observadas em cepas produtoras de AmpC induzíveis.

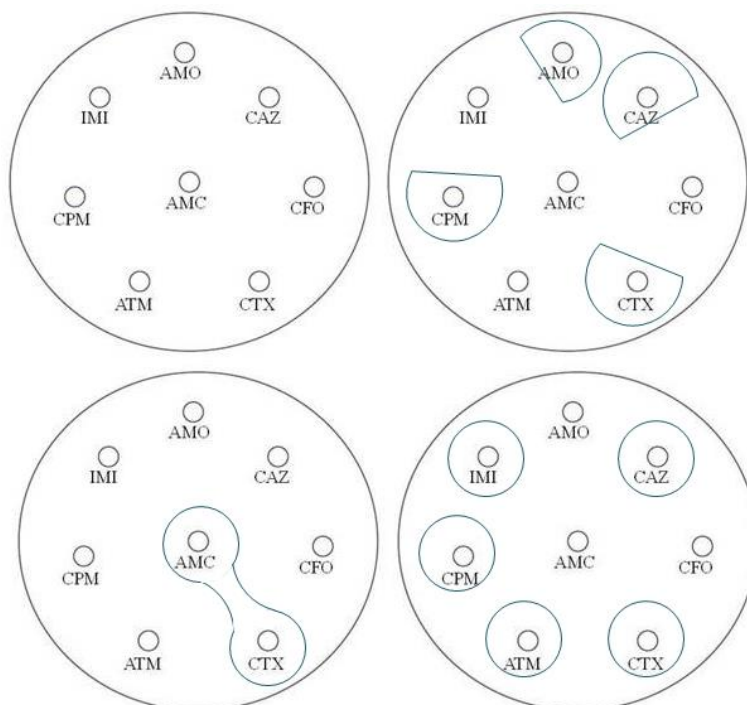


Figura 7. Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa. AMO- amoxicilina, AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, CAZ – ceftazidima, CFO – cefoxitina, CTX – cefotaxima, ATM – aztreonam, CPM – cefepime, IMI – imipenem. A avaliação interpretativa em teste de difusão em ágar é realizada a partir da observação de antagonismo e sinergismo entre os discos de β-lactâmicos e o indutor de AmpC (imipenem, cefoxitina) ou inibidor de β-lactamases (ácido clavulânico), respectivamente,

como demonstrados na segunda e terceira figura. A presença de antagonismo (formação de “zona D”) entre os discos de cefotaxima e/ou ceftazidima e cefoxitina (indutor), e/ou entre os discos de imipenem (indutor) e cefepime demonstra que a cepa estudada é suspeita de produzir AmpC induzível, como observado na segunda figura. Em caso de cepas que apresentam sinergismo entre os discos de β -lactâmicos e de amoxicilina com ácido clavulânico (inibidor) há suspeita da produção de ESBL pela formação de uma junção entre os halos de suscetibilidade, como visto na terceira figura. Em cepas suspeitas de produzirem AmpC codificada por gene de origem plasmidial, pode-se observar resistência à cefoxitina sem antagonismo entre os discos de β -lactâmicos, como demonstrado na quarta figura.

4.4.2 Inibição pela cloxacilina

Após a confirmação das características fenotípicas de resistência ao teste de difusão em ágar em AMH, foi feito o mesmo procedimento do teste com os antimicrobianos: amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima e imipenem, adicionados ao AMH com 200 μ g/mL cloxacilina (Sigma-Aldrich) (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Pires et al., 2015). A leitura deu-se pela observação do aumento da suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos (CLSI, 2014) e da não expressão de antagonismo, demonstrando a inibição da enzima AmpC pela cloxacilina adicionada ao meio.

4.4.3 Inibição pelo ácido borônico

Em AMH, inoculou-se os isolados com suabe, e sobre o meio de cultura foram colocados um disco de cefoxitina e um disco de cefoxitina com 400 μ g de ácido borônico (AB) (anexo 1). Após 24h a 35°C, foram considerados produtores de AmpC os isolados para os quais o disco contendo ácido borônico apresentou um aumento no diâmetro do halo de valor igual ou maior que 5mm com relação ao disco contendo apenas cefoxitina (Coudron, 2005). Uma cepa de *Escherichia coli* previamente caracterizada como produtora de CMY-2 e a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 foram os controles positivo e negativo, respectivamente.

4.4.4 Concentração inibitória mínima (MIC) com cefoxitina

Os isolados resistentes à cefoxitina foram submetidos à determinação de MIC seguindo as orientações do CLSI (2014). O teste foi realizado em microplaca de ELISA, inoculando em cada poço o caldo Infusão de Cérebro e Coração (CBHI) (Himedia) os isolados ajustados para a escala 0,5 de MacFarland com as seguintes concentrações de cefoxitina (Labesfal): 4, 8, 16, 32 μ g/mL. Após 20h de incubação à 35°C, foi realizada a leitura do teste adicionando-se 10 μ L de resazurina 0,01% que em presença de células viáveis é reduzida da cor azul para rosa, facilitando a leitura da MIC (Mann e Markham, 1998; Silva, 2009).

4.4.5 Concentração inibitória mínima (MIC) com cefoxitina e cloxacilina

Os isolados com concentração inibitória maior ou igual a 4 foram testados para a inibição de AmpC pela MIC com cefoxitina (Labesfal) e cloxacilina (Sigma-Aldrich). O teste foi realizado em microplaca de ELISA, inoculando em cada poço o CBHI os isolados ajustados para a escala 0,5 de MacFarland com as seguintes concentrações de cefoxitina em pó: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 μ g/mL; e concentração de 200 μ g/mL de cloxacilina. Após 20h de incubação à 35°C, foi realizada a leitura do teste adicionando-se 10 μ L de resazurina 0,01% (Mann e Markham, 1998).

4.5 Caracterização Bioquímica de β -lactamase Tipo AmpC

4.5.1 Preparação do extrato bruto

Quatro ensaios foram realizados para a obtenção do extrato bruto, durante a padronização da técnica, na FFUP:

- 1°. Ensaio sem pressão - os isolados foram inoculados em 20 mL de TSB e incubados por 24h a 35°C. Após essa incubação foram realizadas as técnicas de centrifugação, choque térmico e sonicação, explicadas posteriormente (Gonçalves, 2008).
- 2°. Ensaio com pressão com cefoxitina - os isolados foram inoculados em 20 mL de TSB com um disco de cefoxitina (30 μ g) e em seguida foram incubados por 24h a 35°C. Em seguida, deu-se a retirada do disco de antimicrobiano dos meios e as etapas de centrifugação, choque térmico e sonicação.
- 3°. Ensaio com dupla pressão (cefoxitina e cefotaxima) - os isolados bacterianos foram inoculados em 20mL de meio TSB com um disco de cefoxitina (30 μ g) e um disco de cefotaxima (30 μ g). Após incubação à 35°C por 24h, os discos de antimicrobianos foram retirados do meio e a cultura foi centrifugada, submetida a choque térmico e sonicação.
- 4°. Ensaio com dupla pressão por 3 dias - os isolados bacterianos foram inoculados em 20mL de meio TSB com um disco de cefoxitina (30 μ g) e um disco de cefotaxima (30 μ g). Após incubação à 35°C por 24h, os discos de antimicrobianos foram retirados do meio, a cultura centrifugada a 1550g, durante 10 minutos, a 4°C (SIGMA 6K15, Sigma-Aldrich, Osterode am Harz, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Vinte mililitros de TSB foram adicionados ao precipitado e um disco de cefoxitina (30 μ g) e um disco de cefotaxima (30 μ g) foi adicionado ao meio de cultura e incubou-se a 35°C por 24h. Realizou-se esse procedimento após a incubação. No quarto dia, foi realizada a extração da enzima submetendo o meio às técnicas de centrifugação, choque térmico e sonicação.

Em todos os ensaios, a centrifugação das amostras, o choque térmico e a sonicação foram realizados seguindo o mesmo protocolo: após o referido período de incubação, os meios foram centrifugados a 1550g, durante 10 minutos, a 4°C (SIGMA 6K15, Sigma-Aldrich, Osterode am Harz, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e se adicionou ao precipitado 20mL de água destilada estéril, para lavagem das células. Centrifugou-se o meio novamente sob as condições especificadas anteriormente. Este procedimento de lavagem e centrifugação foi realizado por três vezes. Na última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado juntamente à água residual constituíram o extrato bruto da amostra, que foi transferido para um microtubo de 1,5mL. O extrato bruto foi submetido ao choque térmico obedecendo à sequência de congelamento (-20°C) e descongelamento em banho-maria (37°C). O procedimento foi ser repetido por cinco vezes, a fim de proporcionar a liberação das β -lactamases presentes no espaço periplasmático. Os microtubos contendo extrato bruto foram submetidos a sonicação (Sonics VibraCell VC130PB, Nestown, U.S.A.): colocou-se o microtubo em uma caixa de isopor com gelo e o transdutor foi inserido em contato com o extrato bruto. A frequência utilizada foi de 80Hz durante 4 segundos por 8 vezes, com intervalos de 5 minutos entre uma sonicação e outra.

Os extratos brutos foram congelados a -80°C até avaliação prévia e foram conservados sob essas condições para utilização na focagem isoelétrica.

4.5.2 Avaliação prévia do extrato bruto

Com o propósito de avaliar a atividade de AmpC no extrato bruto da amostra, foi realizado um ensaio prévio com solução de cefalosporina cromogênica, Nitrocefim (1mg/mL) (Oxoid; Sigma).

Os extratos brutos foram descongelados e centrifugados por 1 minuto a 9724g. Em uma placa de petri estéril, colocou-se 5 μ L do sobrenadante de extrato bruto com igual quantidade da solução de nitrocefim (1mg/mL). Na presença de isolados produtores de β -lactamases, o anel β -lactâmico da cefalosporina cromogênica é hidrolisado pela enzima. O resultado é visualizado pela mudança de cor da solução, de amarelo para laranja/vermelho, num período de tempo igual ou inferior a 10 segundos – evidência da atividade β -lactamásica do extrato (Gonçalves, 2008).

4.5.3 Determinação do ponto isoeletrico da β -lactamase

A determinação do ponto isoeletrico (pI) das β -lactamases foi realizada no sistema Phast System (Pharmacia, Uppsala, Suécia), através da utilização de gel comercial de poli(acrilamida) contendo anfólitos com gradiente de pH entre 3 e 9 (PhastGel IEF 3-9, GE Healthcare). O gel de poli(acrilamida) com anfólitos foi colocado na placa do aparelho, aderido por uma gota de água destilada estéril. Os extratos brutos foram descongelados e centrifugados. Sobre a superfície limpa da placa acessória para as amostras, colocou-se 5 μ L do sobrenadante de cada extrato bruto, fez-se isso para todos os extratos testados e encostou-se o pente de focagem nos volumes colocados na placa acessória. Encaixou-se o pente no aparelho de focagem e deu-se seguimento o programa selecionado para a focagem isoeletrica. Ao fim do tempo de corrida, retirou-se o gel do aparelho e o colocou em uma placa de petri estéril para revelação das bandas por adição de aproximadamente 6 mL de solução de nitrocefim (1mg/mL). Após alguns segundos, pode-se observar as bandas em cor rósea no gel de poli(acrilamida) (Gonçalves, 2008).

4.5.4 Identificação da β -lactamase por focagem isoeletrica

A identificação das β -lactamases foi feita por comparação com as bandas encontradas nas cepas padrão *Escherichia coli* NCTC13451 e *Escherichia coli* CMY-2 com enzimas previamente conhecidas: OXA-1 (pI7,4), TEM-1 (pI5,4) e CTX-M-15 (pI8,9), e CMY-2 (pI9,0), respectivamente (Verdet et al., 1998; Philippon et al., 2002; Haldorsen et al., 2008; Rodríguez et al., 2009; Vingoupoulow et al., 2014).

4.6 Avaliação da Origem Plasmidial do Gene por Conjugação

4.6.1 Seleção das espécies doadoras de plasmídeo conjugativo

Os isolados suspeitos de produzirem AmpC foram submetidos ao teste de suscetibilidade à estreptomicina (10 μ g) (Oxoid; Sensidisc) para confirmação da sensibilidade a este antimicrobiano, segundo CLSI (2014). A cepa receptora de plasmídeos conjugativos utilizada foi *Escherichia coli* HB101, resistente à estreptomicina, não fermentadora de lactose.

4.6.2 Preparo dos isolados para conjugação

Os isolados foram inoculados em ágar CLED (Liofilchem; Himedia), a 35°C por 24h. A partir desse crescimento inoculou-se uma colônia da bactéria doadora em 2mL de meio de cultura TSB (Liofilchem; Himedia) contendo um disco de cefoxitina (30µg) e incubou-se a suspensão a 35° por 24h. Retirou-se 200µL dessa suspensão contendo a cepa doadora e inoculou-se o volume em 2mL de TSB sem antimicrobiano, e em paralelo, inoculou-se uma colônia da cepa receptora, *Escherichia coli* HB101, para 5mL de TSB, os caldos foram incubados na estufa a 35°C por 24h. As suspensões obtidas foram utilizadas no método de conjugação em meio líquido.

4.6.3 Conjugação bacteriana

4.6.3.1 Conjugação em meio sólido

No centro de uma placa de meio de AMH, colocou-se 200µL da suspensão contendo o isolado doador e sobre esse líquido adicionou-se igual volume da suspensão contendo a cepa receptora, e incubados a 35°C. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada isolado, pois uma placa foi avaliada após 6h de incubação e a outra após 24h. Em seguida, a massa crescida no meio foi ressuspensa em 1mL de soro fisiológico estéril e desta suspensão avaliou-se a presença de transconjugantes (Gonçalves, 2008). Esta metodologia foi realizada durante a padronização das técnicas na FFUP, por isso foi realizada apenas nos isolados de enterobactérias oriundas de amostras clínicas, devido aos resultados obtidos.

4.6.3.2 Conjugação em meio líquido

Retirou-se 200µL do meio TSB contendo a bactéria doadora e adicionou-se a 2mL de TSB. Nesta suspensão foram acrescentados 400µL do meio contendo a cepa receptora e incubou-se a 35°C (Gonçalves, 2008). Avaliou-se a conjugação após 6h e 24h de incubação. Esta metodologia foi realizada na FFUP durante a padronização das técnicas e, posteriormente, na UFRRJ apenas com incubação de 6 horas devido aos resultados obtidos.

4.6.4 Seleção das transconjugantes

Após o período estabelecido, retirou-se 200µL da suspensão após a conjugação em meio sólido e em meio líquido e espalhou-se em AMC com marcador de seleção (cefexitina 10µg/mL - Labesfal e estreptomicina 100µg/mL - Sigma-Aldrich) e incubou à 35°C por 24h (Gonçalves, 2008). Após a incubação pelo tempo descrito acima, verificou-se o crescimento de transconjugantes: isolados não fermentadores de lactose resistentes à estreptomicina e à cefexitina.

A partir desse crescimento bacteriano no meio seletivo para transconjugantes, foram selecionadas cinco colônias para serem reisoladas em nova placa de AMC com marcador de seleção (cefexitina - 10µg/mL, estreptomicina - 100µg/mL) para confirmação das características de transconjugantes. Após incubação a 35°C por 24h, observaram-se as características das colônias que cresceram no meio e selecionaram-se 2 para serem utilizadas nas próximas etapas de confirmação da transferência do plasmídeo conjugativo. No caso das cepas pertencentes a espécies não fermentadoras de lactose, a confirmação também foi

realizada semeando-se estas cepas crescidas no meio seletivo em: CHROMagar orientation, nos isolados estudados na FFUP, e meio Kligler nas cepas estudadas na UFRRJ (Quadro 5).

Quadro 5 . Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006)

Leitura	Interpretação	Diagnóstico presuntivo
Reação ácida (amarelo) e gás na profundidade. Reação ácida na superfície. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose e fermentação da lactose, inclusive com produção de gás.	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Providencia, Serratia</i>
Reação ácida e gás na profundidade. Superfície alcalina (vermelha). Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose sem ataque á lactose.	<i>Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter, Proteus</i>
Reação ácida sem gás na profundidade, superfície alcalina. Ausência de H ₂ S.	Glicose fermentada apenas formando ácido; nenhuma ação sobre a lactose.	<i>Shigella, Salmonella, Proteus, Providencia, Serratia, Yersinia</i>
Meio inteiramente ácido com gás. Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose com gás; fermentação da lactose.	<i>Citrobacter, Proteus</i>
Meio inteiramente ácido sem gás. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose com formação de ácido; fermentação da lactose.	<i>Escherichia coli, Serratia</i>

4.6.5 Confirmação da transferência de AmpC

A confirmação fenotípica da transferência foi avaliada pelo teste de suscetibilidade ao antimicrobiano em meio sólido (Teste de Difusão em Ágar – CLSI, 2014) como realizado para as células doadoras. O estudo molecular para confirmação da transferência dos genes codificantes de β -lactamase AmpC foi feito por PCR, seguindo a mesma metodologia utilizada nas células doadoras, assim como para a focagem isoeletrica cuja extração da enzima foi realizada apenas pelo ensaio de inoculação das transconjugantes em TSB com dupla pressão por 3 dias.

4.6.6 Avaliação de transferência de resistência associada

A presença de resistências associadas à de β -lactâmicos pode ocorrer caso os genes estejam contidos no mesmo plasmídeo conjugativo. Para avaliar tal característica, foi realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana com outras classes antimicrobianas, tanto para as transconjugantes quanto para as bactérias doadoras. Os antimicrobianos utilizados, suas concentrações e zonas de inibição (CLSI, 2013 e 2014) estão descritos no quadro 6.

Quadro 6. Antimicrobianos utilizados na avaliação de resistência associada, nos transconjugantes e bactérias doadoras, e seus respectivos pontos de corte

Antimicrobianos	µg	Resistente	Intermediário	Sensível
Amicacina ^{1/2}	30	≤14	15-16	≥17
Cefalotina ^{1/2}	30	≤14	15-17	≥18
Cefuroxima ¹	30	≤14	15-22	≥23
Ciprofloxacina ¹	5	≤15	16-20	≥21
Cloranfenicol ¹	30	≤12	13-17	≥18
Doripenem ¹	10	≤19	20-22	≥23
Ertapenem ¹	10	≤18	19-21	≥22
Fosfomicina ¹	200	≤12	13-15	≥16
Gentamicina ² *	10	≤12	13-15	≥16
Meropenem ¹	10	≤19	20-22	≥23
Nitrofurantoína ^{1/2}	300	≤14	15-16	≥17
Norfloxacina ¹ *	10	≤12	13-16	≥17
Piperacilina ¹	100	≤17	18-20	≥21
Piperacilina+Tazobactam ¹	100/10	≤14	15-20	≥21
Tigeciclina ³	15	≤14	15-18	≥19
Tetraciclina ²	30	≤11	dez/14	≥15
Tobramicina ¹	10	≤12	13-14	≥15
Sulfa-trimetoprim ^{1/2} *	1,25/23,75	≤10	nov/15	≥16

Legenda: 1- CLSI 2014; 2- CLSI Vet 2013; 3 – EUCAST (2014). * Utilizados nas cepas estudadas em ambas as instituições, os demais foram avaliados apenas nas cepas de origem clínica.

4.7 Confirmação Genotípica de β-lactamase AmpC

4.7.1 Extração de DNA por lise térmica

Após crescimento dos isolados em ágar CLED (Liofilchem), retirou-se uma colônia do isolado e ressuspendeu-a em 100µL de água ultrapura estéril. A seguir, foi realizada a lise térmica em termociclador T100TM Thermal Cycler (BioRad) por 10 minutos a 100°C. A suspensão foi centrifugada (ScanSpeed Mini, Labogene) a 9.724g por 5 minutos e ao fim o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro microtubo. O DNA extraído foi congelado a -20°C para posterior amplificação por PCR (Féria *et al.*, 2002).

4.7.2 Técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e eletroforese em gel de agarose

O *primers* utilizados na detecção de β -lactamases tipo AmpC, o tamanho molecular dos produtos amplificados, as condições e referências estão descritas no quadro 7.

Quadro 7. *Primers* para pesquisa de β -lactamases AmpC

Enzima/Alvo	Primer	Amplicon (pb)	Sequência	Condições de PCR	Referência
AmpC / gene universal AmpC	ampC F ampC R	634	CCC CGC TTA TAG AGC AAC AA TCA ATG GTC GAC TTC ACA CC	95°C 15min., (94°C 1 min., 58°C 2min., 72°C 3min.)x35, 72°C 10min.	Sobia et al., 2011
AmpC / gene inteiro AmpC	IntB2 IntHN	1315	TTC CTG ATG ATC GTT CTG CC AAA AGC GGA GAA AAG GTC CG	95°C 5 min., (95°C 1 min., 60°C 1min., 72°C 1min.)x30, 72°C 5min.	Mammeri et al., 2006; 2007; 2008
AmpC / gene promotor AmpC	AB1 AmpC2	271	GAT CGT TCT GCC GCT GTG GGG CAG CAA ATG TGG AGC AA	95°C 5 min., (95°C 1 min., 58°C 1min., 72°C 30s.)x30, 72°C 5min.	Caroff et al., 2000; Corvec et al., 2002
CMY / grupo CMY	CMY F CMY R	1256	GGG CCC GGA CAC CYT TTT GC TAA GTG TAG ATG ACA RCA GG	(94°C 1min., 54°C 1min., 72°C 1 min.)x 35	D'Andrea et al., 2006
DHA-1, DHA-2 / grupo DHA	DHAM F DHAM R	1043	ACA CTG ATT TCC GCT CTG CT ACA ATC GCC ACC TGT TTT TC	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Roche et al., 2008
AmpR / regulador DHA	AmpR (F)	1738	CAG GGT AAA GCG GTG AAC AT		
ACC / grupo ACC	ACCM F ACCM R	346	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002
LAT-1 ao LAT-4, CMY-2 ao CMY-7, BIL-1 / grupo CIT	CITM F CITM R	462	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002
MIR-1T ACT-1 / grupo EBC	EBCM F EBCM R	302	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002
FOX-1 ao FOX-5b / grupo FOX	FOXM F FOXM R	190	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 ao CMY-11 / grupo MOX	MOXM F MOXM R	520	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	94°C 3min., (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min.)x25, 72°C 7 min.	Pérez-Pérez e Hanson, 2002

Cada reação de PCR para *ampC* e CMY continha 20 mM Tris_HCl, pH 8.4; 50 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂; 0,6 μM de cada *primer*; e 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Kapa Biosystems; Fermentas) em um volume total de reação de 25μl contendo 2μl do DNA extraído. As concentrações dos *primers* utilizados para os multiplex seguiram o descrito por Pérez-Pérez e Hanson (2002) e por Roche e colaboradores (2008). Utilizou-se o termociclador T100™ Thermal Cycler (BioRad) para as reações de PCR e os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose (2%), revelado com Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics) (FFUP) e com SYBER Green (Invitrogen)(UFRRJ), e utilizados os marcadores de peso molecular de 100pb (GRISP; Fermentas) e de 1000pb (Bioron; Fermentas). A revelação dos géis foi feita em fotodocumentador BioRad (Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software, BIO RAD) (FFUP) e em fotodocumentador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia) (UFRRJ).

Foram utilizadas cepas controle para as reações de PCR: *Escherichia coli* CMY-2 – controle positivo para AmpC, CMY, CIT, e *Escherichia coli* ATCC25922 – controle negativo para todos os *primers* utilizados.

4.8 Sequenciamento de *ampC*

Doze cepas de *Escherichia coli* (Quadro 8) com e sem perfil de resistência à cefoxitina, marcador para o mecanismo de resistência em estudo, foram selecionadas para análise do gene *ampC*, por sequenciamento. Com base nos resultados do sequenciamento, foram avaliadas as mutações nestes genes e a consequência na atividade de AmpC. Destas amostras, seis são suspeitas de produzirem ESAC, três de super produzirem AmpC e três de produzirem AmpC cromossomal natural da espécie.

Quadro 8 – Cepas selecionadas para sequenciamento da região promotora e gene inteiro AmpC e suas características fenotípicas e genotípicas bem como a suspeita de enzima produzida

Isolado	Perfil Fenotípico	Perfil Genotípico	Suspeita Principal	Outro Mecanismo
F1	-	AmpC	AmpC cromossomal	-
F6	CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	-
F8	AMO, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	-
F11	CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ESBL
F21	CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	-
F25	AMO, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ESBL
G18	AMO, AMC, CFO	AmpC	superprod de AmpC	-
G27	AMO, AMC, CFO	AmpC	superprod de AmpC	-
30A	AMC	AmpC	AmpC cromossomal	-
N18	AMO, AMC, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ESBL
S10	AMO, AMC, CFO	AmpC	superprod de AmpC	-
S100	AMO, AMC	AmpC	AmpC cromossomal	-

Legenda: AMO – amoxicilina, AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, CFO – cefoxitina, COM – cefepime; ESAC – AmpC de Espectro Estendido; ESBL – β-lactamase de Espectro Estendido.

Para o sequenciamento da região promotora do gene, o DNA total foi amplificado com os *primers* AB1 e AmpC2 e para o sequenciamento da região codificadora, foram utilizados os *primers* IntB2 e IntHN. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB

Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e, em seguida, submetido ao sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems.

As sequências foram editadas utilizando o programa DNA Sequence Assembler v4 (2013) Heracle BioSoft (www.DnaBaser.com), e posteriormente foram alinhadas com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997) no programa Mega v7 (Caspermeyer, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cepas Estudadas na FFUP: Enterobactérias Isoladas de Casos Clínicos Humanos de Portugal e Enterobactérias Isoladas de Leite Mastítico Bovino Brasileiro

As enterobactérias oriundas de diferentes setores e amostras clínicas coletadas em um hospital na região norte de Portugal em 2009, foram estudadas acerca da produção de β -lactamases. Tais isolados foram identificados ao nível de espécie e classificados como produtores de ESBL, carbapenemases e de AmpC (Gonçalves, 2013).

As enterobactérias produtoras de AmpC, congeladas a -80°C , foram cedidas para o experimento de padronização das técnicas de conjugação e focagem isoelétrica que foram posteriormente utilizadas em isolados de origem animal de importância nessa tese. Além da padronização das técnicas pode-se aprofundar os conhecimentos sobre a enzima AmpC bem como confirmar a produção da enzima e a origem dos genes codificantes de AmpC nos isolados oriundos de humanos.

A partir de 116 enterobactérias provenientes de amostras clínicas humanas, previamente identificadas como produtoras de AmpC, selecionaram-se aleatoriamente 18 cepas, a maioria obtidos a partir de amostra urinária: *Klebsiella pneumoniae* (n=14), *Escherichia coli* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), 1 *Proteus mirabilis* (n=1). Essas espécies são comumente encontradas em amostras clínicas e dentre os Gram negativos, a espécie *Klebsiella* spp. é prevalente. *K. pneumoniae* é um agente comum de infecções nosocomiais podendo causar pneumonias, infecção do trato urinário e também septicemia (Daef e Elsherbiny, 2012; Azimi *et al.*, 2015).

Após o reisolamento, as espécies bacterianas foram confirmadas por CHROMagar *orientation* (Figura 8). Naqueles isolados pertencentes ao grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) realizou-se o teste bioquímico pelo kit ID32GN. Ao final, todas as cepas tiveram sua espécie confirmada.

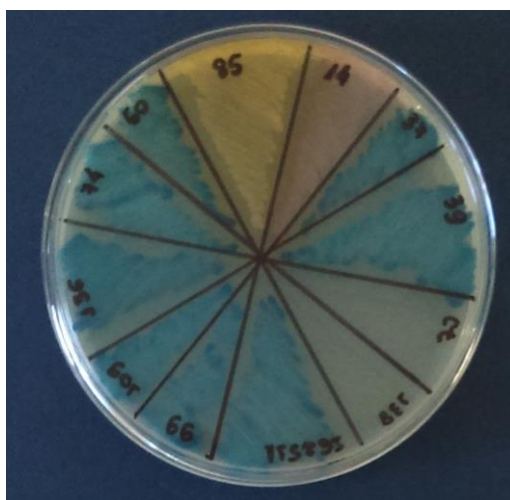


Figura 8. CHROMagar *orientation*. Os isolados que apresentaram coloração azul foram classificados como pertencentes ao grupo KESC, sendo portanto necessário o uso de métodos bioquímicos para identificação a nível de espécie. O isolado cujas colônias apresentaram a coloração amarela com bordas marrons foi identificado como *Proteus* spp. e confirmada sua espécie por teste bioquímico. O isolado que apresentou coloração vermelha foi classificado como *Escherichia coli*.

A produção da β -lactamase AmpC confere à bactéria resistência às cefalosporinas com exceção ao cefepime, e a hidrólise do anel β -lactâmico ocorre de maneira mais específica nas cefamicinas, cujo representante utilizado na detecção dessa característica foi a cefoxitina. Além disso, essas enzimas não sofrem ação dos inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico. A fim de confirmar esse fenótipo foi realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana com os β -lactâmicos: amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, imipenem e cefepime (Figura 9).

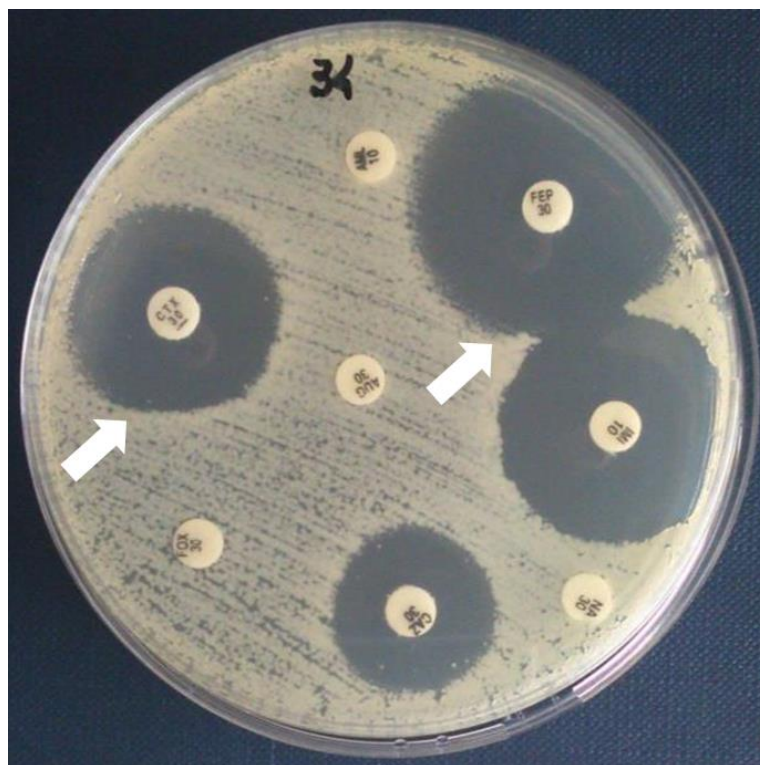


Figura 9. Teste de suscetibilidade antimicrobiana realizado para confirmação do fenótipo de resistência codificado por enzimas AmpC. Observa-se a resistência à cefoxitina, à amoxicilina e à amoxicilina combinada ao inibidor de β -lactamase, ácido clavulânico. Os demais halos formados foram avaliados seguindo os critérios do CLSI (2013,2014). Nessa placa, as setas em branco indicam as regiões de ligeiro achatamento nos halos, também denominado “zona em D”, ocasionado pelos indutores de AmpC: o imipenem (IMI) e a cefoxitina (FOX). A distância entre os halos é de 20mm. O ácido nalidíxico (NA) foi incluído nesse teste para avaliar a suscetibilidade das cepas a este antimicrobiano, para posterior seleção da cepa padrão utilizada na técnica de conjugação.

Muitas espécies incluindo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, são produtoras naturais de AmpC e sua expressão é baixa porém induzível. Essa indução é percebida pela exposição da bactéria a alguns β -lactâmicos como amoxicilina, ampicilina, imipenem e ácido clavulânico (Martínez-Rojas, 2009; Bush e Jacoby, 2010). Em trabalho realizado por Dunne e Hardin (2005), os autores sugerem a utilização do disco de imipenem na pesquisa desta indução que é frequentemente cromossomal, como podemos observar na figura 4, ao contrário do gene plasmidial que é sempre expresso e não causa tal deformação no halo. Esta avaliação é subjetiva e em algumas situações não se consegue observar a inibição pelo antimicrobiano. Outro fator importante é a discordância entre autores sobre a utilização desta metodologia para determinação da origem do gene responsável pela produção da enzima, pois o gene DHA plasmidial codifica uma AmpC induzível como ocorre no de origem cromossômica (Reisbig e Hanson, 2004). Em nosso estudo 61,1% das cepas não

apresentaram antagonismo, ou seja, foram consideradas produtoras de *ampC* de origem plasmidial. A tabela 1 mostra os perfis de suscetibilidade aos β -lactâmicos e a avaliação do antagonismo, nas cepas estudadas.

Tabela 1. Avaliação e confirmação das características fenotípicas de resistência AmpC nas enterobactérias estudadas e nas cepas controle dos ensaios

Cepa	Espécie	Perfil de Resistência	Antagonismo
FFUP1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
FFUP2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX	SIM
FFUP3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	SIM
FFUP4	<i>Enterobacter agglomerans</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
FFUP5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
FFUP7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	SIM
FFUP8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP9	<i>Escherichia coli</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	NÃO
FFUP10	<i>Proteus mirabilis</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX - FEP - IMI	NÃO
FFUP11	<i>Escherichia coli</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
FFUP12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
FFUP15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
FFUP17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	NÃO
FFUP18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM
NCTC13451	<i>Escherichia coli</i>	AML - AUG - CAZ	NÃO
CMY-2	<i>Escherichia coli</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO
HB101	<i>Escherichia coli</i>	S	NÃO

Legenda: AML – amoxicilina, AUG – amoxicilina com ácido clavulânico, FOX – ceftaxima, CTX – cefotaxima, FEP – cefepime, IMI – imipenem, S – estreptomicina. A presença de antagonismo sugere a presença de AmpC de origem cromossomal e a ausência, de plasmidial.

Como testes confirmatórios para produção de AmpC foram realizados: teste de inibição da AmpC pela cloxacilina e inibição da AmpC pelo ácido borônico (AB).

O primeiro teste realizado, o de inibição da AmpC pela cloxacilina, foi feito por inoculação da cepa em AMH com cloxacilina (200 μ g/mL) onde foram dispostos os discos dos seguintes antimicrobianos: amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, ceftazidima, ceftaxima, cefotaxima, imipenem, cefepime e aztreonam, nas mesmas concentrações utilizadas no teste de suscetibilidade antimicrobiana realizado para verificação da característica de resistência codificada por *ampC*. Este teste teve como objetivo inibir a ação da enzima AmpC pela cloxacilina e então observar um aumento nos diâmetros dos halos formados em torno dos discos de antimicrobiano. Além disso, a inibição da enzima faz com que não se observe o antagonismo entre os discos de cefalosporina e indutores da enzima, o

que também é denominado de “zona D”. Assim, a observação dessas características demonstra que a produção de AmpC é o mecanismo responsável por causar a resistência observada na cepa.

As cepas estudadas neste trabalho foram submetidas ao teste de inibição pela cloxacilina e não foi possível observar uma inibição completa da atividade da enzima em algumas delas. Porém, ficou evidente a atividade da enzima nas cepas uma vez que houve aumento dos halos, especialmente no halo em torno de cefoxitina onde não havia formação de halo quando na ausência da cloxacilina (Figura 12). Assim, confirma-se a produção de AmpC em 83,3% das enterobactérias estudadas neste trabalho. Em duas cepas de *Escherichia coli* e em uma de *Proteus mirabilis* não houve confirmação da atividade da cloxacilina pois não se observou crescimento bacteriano na placa.

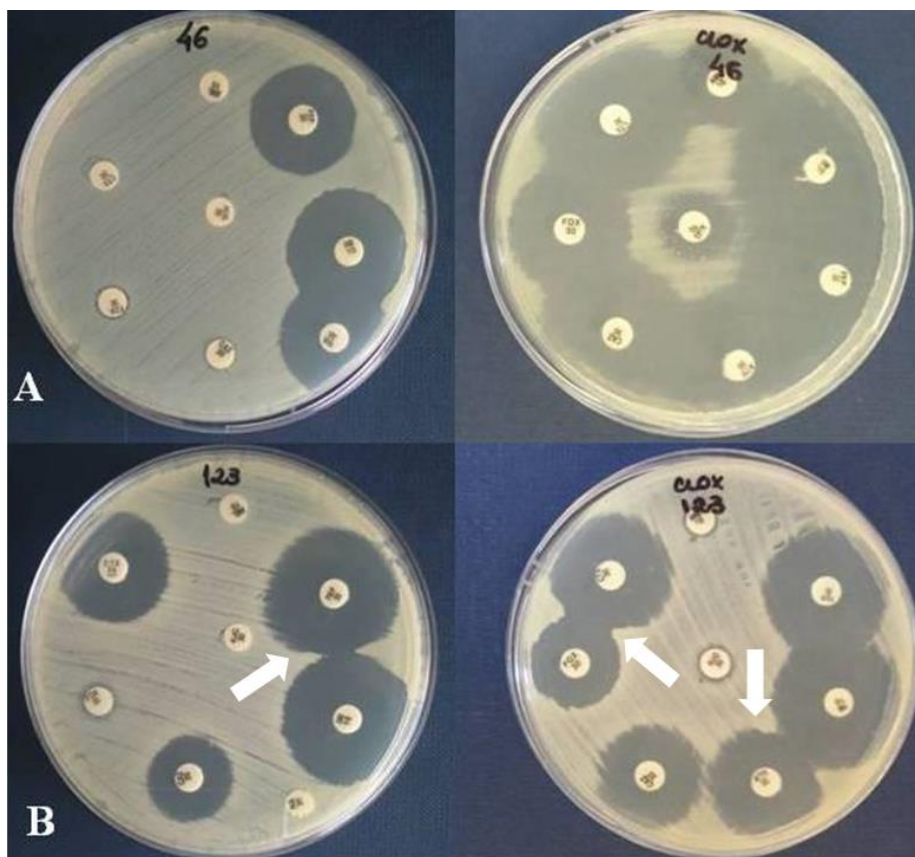


Figura 10. Teste de inibição da AmpC pela cloxacilina. Imagem A – comparação do teste de suscetibilidade antimicrobiana utilizando β -lactâmicos em AMH e o teste realizado em AMH adicionado cloxacilina, inibidor de AmpC. Observa-se que esta cepa produz a enzima e esta é parcialmente inibida pela cloxacilina, visto que há um leve abaulamento no halo formado em torno do antimicrobiano CTX (cefotaxima) devido à indução da produção de AmpC pela FOX (cefotaxina). Imagem B – as duas placas apresentadas são de uma cepa também classificada como produtora de AmpC, e observa-se que a primeira placa, sem adição de cloxacilina, há a presença de pequenos halos em torno dos discos de antimicrobianos testados, ou seja, a enzima determina uma baixa suscetibilidade aos antimicrobianos testados. Na placa seguinte, em mesmo meio agora adicionado de cloxacilina, observa-se um aumento dos halos mas ainda está presente a enzima pois a cepa continua resistente aos antibióticos amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico e a produção de AmpC é induzida pelos antimicrobianos FOX (cefotaxina) e IMI (imipenem), determinado pelo achatamento nos halos de CTX (cefotaxima) e ATM (aztreonam), como indicado pelas setas em branco.

Outro teste confirmatório utilizado foi o de adição de ácido borônico em disco de cefoxitina. Esta metodologia foi realizada paralelamente com a avaliação do disco de

cefotaxima sem adição do ácido. Assim foi possível confirmar se havia produção de AmpC, uma vez que o ácido borônico atua inibindo a ação da mesma enzima e resulta no aumento de valor igual ou maior que 5mm no diâmetro formado em torno do disco de antimicrobiano com o inibidor comparado ao sem inibidor, como podemos observar na figura 11.

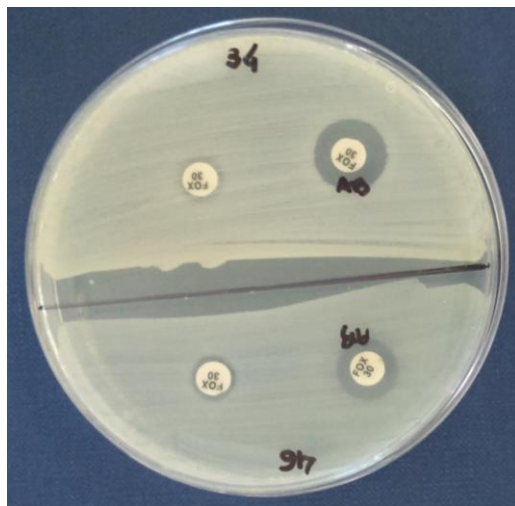


Figura 11. Teste de inibição da AmpC pelo ácido borônico. Legenda: 34 e 46 são as cepas testadas, não sendo possível avaliar o halo de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco de cefotaxima (FOX) e a formação de halo ao redor do disco de cefotaxima (FOX) adicionado de ácido borônico (AB), segundo a metodologia. Ambas as cepas foram confirmadas quanto à produção de AmpC, uma vez que a diferença entre os halos formados em torno do disco de cefotaxima e cefotaxima com AB foi maior que 5mm. Este teste foi realizado em todas as cepas e suas transconjugantes.

O teste de adição de AB ao disco de cefotaxima foi realizado para todas as cepas inclusive para seus transconjugantes e obteve-se confirmação da produção de AmpC (Tabela 2). A cepa CMY-2 e sua transconjugante também foram submetidas ao teste e houve aumento do halo de inibição quando adicionado AB, confirmando a produção da enzima AmpC pelos controles.

Tabela 2. Avaliação e confirmação das características fenotípicas de resistência AmpC nas enterobactérias estudadas e na cepa *Escherichia coli* CMY-2 usada como controle do ensaio: avaliação do diâmetro do halo (mm) formado em torno do disco de cefotaxima e em torno do disco de cefotaxima adicionado AB

Cepa	Identificação	Halo cefotaxina	Halo cefotaxina+AB	Diferença entre halos	Confirmação de AmpC por este teste
FFUP1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	20	4	NÃO
FFUP2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	13	7	SIM
FFUP3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	16	2	NÃO
FFUP4	<i>Enterobacter agglomerans</i>	6	11	5	SIM
FFUP5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	15	9	SIM
FFUP6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	20	7	SIM
FFUP7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	18	6	SIM
FFUP8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	20	2	NÃO
FFUP9	<i>Escherichia coli</i>	9	16	7	SIM

Tabela 2. Continuação: Avaliação e confirmação das características fenotípicas de resistência AmpC nas enterobactérias estudadas e na cepa *Escherichia coli* CMY-2 usada como controle do ensaio: avaliação do diâmetro do halo (mm) formado em torno do disco de cefoxitina e em torno do disco de cefoxitina adicionado AB

Cepa	Identificação	Halo cefoxitina	Halo cefoxitina+AB	Diferença entre halos	Confirmação de AmpC por este teste
FFUP10	<i>Proteus mirabilis</i>	11	19	8	SIM
FFUP11	<i>Escherichia coli</i>	16	19	3	NÃO
FFUP12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	20	4	NÃO
FFUP13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	16	6	SIM
FFUP14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	13	6	SIM
FFUP15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	6	SIM
FFUP16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	15	5	SIM
FFUP17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	11	5	SIM
FFUP18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	14	8	SIM
CMY-2	<i>Escherichia coli</i>	11	20	9	SIM

Em 72,2% das cepas houve a confirmação da produção de AmpC pela metodologia proposta da adição do AB ao disco de cefoxitina. Isto confirma, neste caso, a inibição da enzima pelo AB como proposto por Coudron (2005).

A utilização destes métodos de inibição é bastante importante no que tange a confirmação da produção da enzima. No entanto, deve-se ter cautela ao aceitar apenas um teste fenotípico como informação sobre a produção enzimática já que estes testes são muito sensíveis e podem sofrer influências das características do próprio microrganismo e também da avaliação individual do pesquisador. Esses testes devem ser orientadores na busca pelo mecanismo de resistência e devem ser aliados a outros métodos como a biologia molecular.

A análise dos genes codificantes de AmpC foi feita por PCR segundo as condições descritas na metodologia e pode-se detectar a presença de *ampC*, CIT, DHA e CMY. *Primers* utilizados para amplificação de *ampC* foram utilizados para rastrear as cepas que tinham algum gene responsável pela produção de β -lactamase tipo AmpC, uma vez que anelam em uma região codificante comum dessa enzima. Dentre as cepas avaliadas, 83,4% foram positivos para *ampC* (Figura 12). No entanto, em três cepas da espécie *Klebsiella pneumoniae*, com características fenotípicas de produção dessa enzima, não houve detecção deste gene universal. Esta observação pode ser explicada por alguma mutação ocorrida no gene responsável pela produção da enzima nestas cepas, visto que a transferência dos genes cromossomais para o plasmídeo ocasiona tais modificações (Reisbig e Hanson, 2004). Jorgensen e colaboradores (2010) também descreve cepas com características fenotípicas da produção de AmpC sem amplificação do gene.

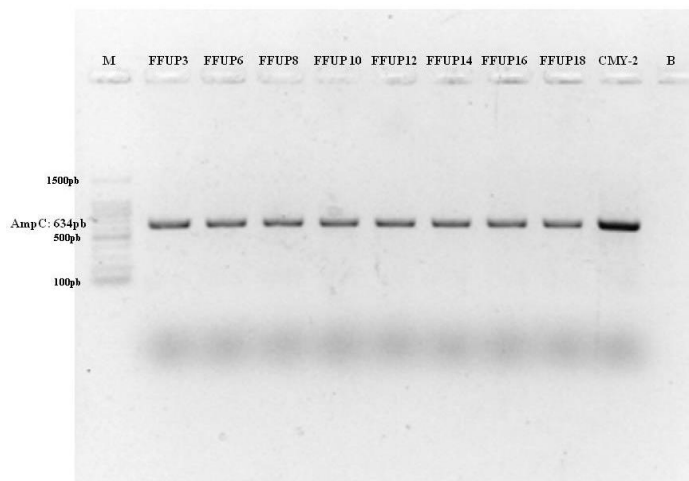


Figura 12. Produtos positivos da PCR para *ampC* em gel de agarose 2%. M – marcador de peso molecular de 100pb; FFUP3, FFUP6, FUP8, FFUP10, FFUP12, FFUP14, FFUP16, FFUP18 – cepas representantes dos produtos positivos para *ampC* (634pb); CMY-2 – cepa controle produtora da enzima CMY-2; B – controle negativo da reação.

A partir de então, foi possível aprofundar este estudo e detectar especificamente qual família de enzimas AmpC eram produzidas por cada cepa (Tabela 3). Para isso, utilizou-se os *primers* para detecção dos grupos enzimáticos ACC, EBC (MIR-1T e ACT-1), CIT (CMY-2 a 7 e LAT-1,3,4), CMY, DHA (DHA-1 e 2), e para detectar o gene regulado de DHA, o *ampR*.

Tabela 3. Resultados da detecção dos genes do grupo AmpC por PCR, nas enterobactérias estudadas

Cepa	Espécie	Genes amplificados por PCR
FFUP1	<i>K. pneumoniae</i>	DHA
FFUP2	<i>K. pneumoniae</i>	CIT - DHA
FFUP3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP4	<i>E. agglomerans</i>	-
FFUP5	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT
FFUP6	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT
FFUP7	<i>K. pneumoniae</i>	CIT - DHA
FFUP8	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP9	<i>E. coli</i>	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP10	<i>P. mirabilis</i>	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP11	<i>E. coli</i>	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP12	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i>
FFUP13	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - DHA
FFUP14	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP15	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - DHA
FFUP16	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP17	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP18	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ampC</i>

Sabe-se que as enzimas da classe CIT são naturalmente produzidas por bactérias *Citrobacter freundii*, e neste estudo o gene que confere a produção de tais enzimas foi detectado em 66,7% das cepas, das espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. O gene responsável pela produção das AmpC da família CMY foi detectado em 16,7% das cepas, sendo estes pertencentes às espécies *Escherichia coli* (n=2) e *Proteus mirabilis* (n=1). Estas três cepas também amplificaram com CIT o que demonstra possivelmente a produção de uma CMY também detectadas pelo CIT, ou seja, CMY-2 a 7. A expressão de mais de um AmpC mediada por plasmídeo em isolados clínicos não foi relatada, isto pode ser explicado por duas razões: a difícil diferenciação entre as diversas AmpC, e a possibilidade de existir um limite para a quantidade de *ampC* que uma bactéria pode acomodar e ainda continuar viável (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). CMY é a AmpC mediada por plasmídeo mais detectada entre Enterobacteriaceae de diversas espécies hospedeiras no mundo e há estudos sobre a possível troca de plasmídeos entre bactérias humanas e animais (Bortolaia *et al.*, 2014).

O grupo de enzimas DHA foi detectado em *Klebsiella pneumoniae* (55,6% das cepas), enzimas naturalmente produzidas por *Morganella morganii*, porém o gene regulador não foi detectado nessas cepas. A ocorrência elevada de DHA em *K. pneumoniae* observada neste estudo corrobora com o trabalho de Freitas *et al.* (2014), realizado em Portugal. A expressão induzível de AmpC é regulada pelo gene *ampR* na presença de dois outros genes *ampD* e *ampG*, e a regulação em genes plasmidiais não ocorre pelos mesmos mecanismos porém continuam a ser elucidados (Reisbig e Hanson, 2004). Assim, apesar do teste fenotípico de indução sugerir a presença de gene cromossomal em algumas cepas não se comprovou a regulação dos mesmos pelo *ampR*, o que nos leva a acreditar na possibilidade do envolvimento de outros mecanismos reguladores nestas cepas ou na possibilidade da localização plasmidial dos genes codificantes de AmpC cuja expressão também é regulada. A origem plasmidial também explica a presença dos genes detectados na técnica molecular, já que estes foram detectados em espécies diferentes daquelas das quais tiveram origem. Uma cepa apresentou *ampC* porém não amplificou com nenhum dos *primers* utilizados. A resistência nesta cepa pode estar associada a outro gene que não foi estudado neste trabalho. No entanto, três cepas (FFUP1, FFUP2 e FFUP7) amplificaram com *primers* específicos mas foram negativos para o *primer* universal AmpC. Tais fatos podem ser devido à uma possível mutação genética quando da transferência do gene para o plasmídeo, não sendo possível detectá-los pelos *primers* utilizados neste estudo. Outra cepa, *Enterobacter agglomerans*, apresentou características fenotípicas de resistência codificada por enzimas AmpC porém não houve amplificação com os genes testados sendo possível uma mutação no gene cromossomal desta cepa (Livermore e Woodford, 2006; Dias *et al.*, 2008; Rayamajhi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013; Bortolaia *et al.*, 2014).

Enterobacteriaceae produtoras de AmpC tem sido relatadas mundialmente, com diferenças geográficas significantes no que tange a prevalência e a epidemiologia dos diferentes tipos de AmpC. Na Europa, as enzimas da família CMY são as AmpC prevalentes seguida pela DHA (Miró *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2014; Ibrahimagic *et al.*, 2015).

Com base em tais dados, buscou-se saber a localização desses genes visto que eles não são naturais dessas espécies e podem ter sido disseminados por plasmídeos conjugativos. Utilizou-se para isso, duas metodologias de conjugação: em meio sólido e em meio líquido, e avaliou-se também a obtenção de transconjugantes em dois momentos: 6 horas e 24 horas de conjugação. O intuito da realização dessa metodologia foi verificar qual o método mais eficaz na obtenção de transconjugantes e também o mais rápido, sendo possível a fácil utilização dessa técnica na confirmação da localização do gene que confere essa resistência em enterobactérias.

Num primeiro momento, todas as cepas foram submetidas ao teste de difusão em ágar para avaliar se eram susceptíveis à estreptomicina e então selecionar a cepa controle a ser utilizada na conjugação, como receptora do plasmídeo conjugativo. Todas foram sensíveis a este antimicrobiano e a cepa receptora selecionada foi *E. coli* HB101 que é uma cepa não fermentadora de lactose e resistente à estreptomicina. Foram selecionados quatro cepas representativas para a realização das duas técnicas e analisados os dois tempos de conjugação, e a cepa controle produtora de CMY-2 também foi utilizada nesse ensaio. A técnica para a conjugação em meio sólido e líquido foi realizada como descrita na metodologia e foram obtidas tranconjugantes (Tabela 4) que foram reinoculadas em AMC com antibióticos para confirmação das características de resistência aos antibióticos e de não fermentação de lactose. Apenas a cepa FFUP11 teve crescimento de colônias róseas que não se confirmaram serem transconjugantes. Provavelmente, a concentração da estreptomicina não foi suficiente para inibir o crescimento da cepa doadora no meio de cultura com pressão. As demais colônias, ao segundo repique em meio de cultura com pressão apresentaram-se com características de não fermentadoras de lactose. Isso deve-se à possível degradação da cefoxitina pela enzima produzida pela colônia bacteriana, transformando o antimicrobiano em seu ácido cefalosporínico correspondente que acidificou o meio e provocou a mudança de cor (Figura 13).

Tabela 4. Técnicas de conjugação para obtenção de transconjugantes: colônias não fermentadoras de lactose e resistentes à cefoxitina e à estreptomicina

	Meio sólido 6 horas	Meio líquido 6 horas	Meio sólido 24 horas	Meio líquido 24 horas
FFUP4	Colônias de coloração rósea; inotável	Colônias de coloração rósea; 655 UFC/mL	Colônias de coloração rósea; 1020 UFC/mL	Colônias incolores; inotável
FFUP11	Colônias de coloração rósea; inotável	Colônias de coloração rósea; 540UFC/mL	Colônias de coloração rósea; inotável	Colônias de coloração rósea; inotável
FFUP13	Colônias de coloração rósea; inotável	Colônias incolores; inotável	Colônias incolores; inotável; colônia rósea: 5 UFC/mL	Colônias incolores; inotável
FFUP15	Colônias de coloração rósea; 645UFC/mL	Colônias de coloração rósea; inotável	Colônias incolores; inotável	Colônias incolores; inotável
CMY-2	Colônias incolores; inotável	Colônias incolores; inotável	Colônias incolores; inotável; Colônia de coloração rósea: 15UFC/mL	Colônias incolores; inotável

Legenda: CMY-2 – cepa previamente caracterizada como produtor de CMY, AmpC plasmidial, usada como controle nos testes.

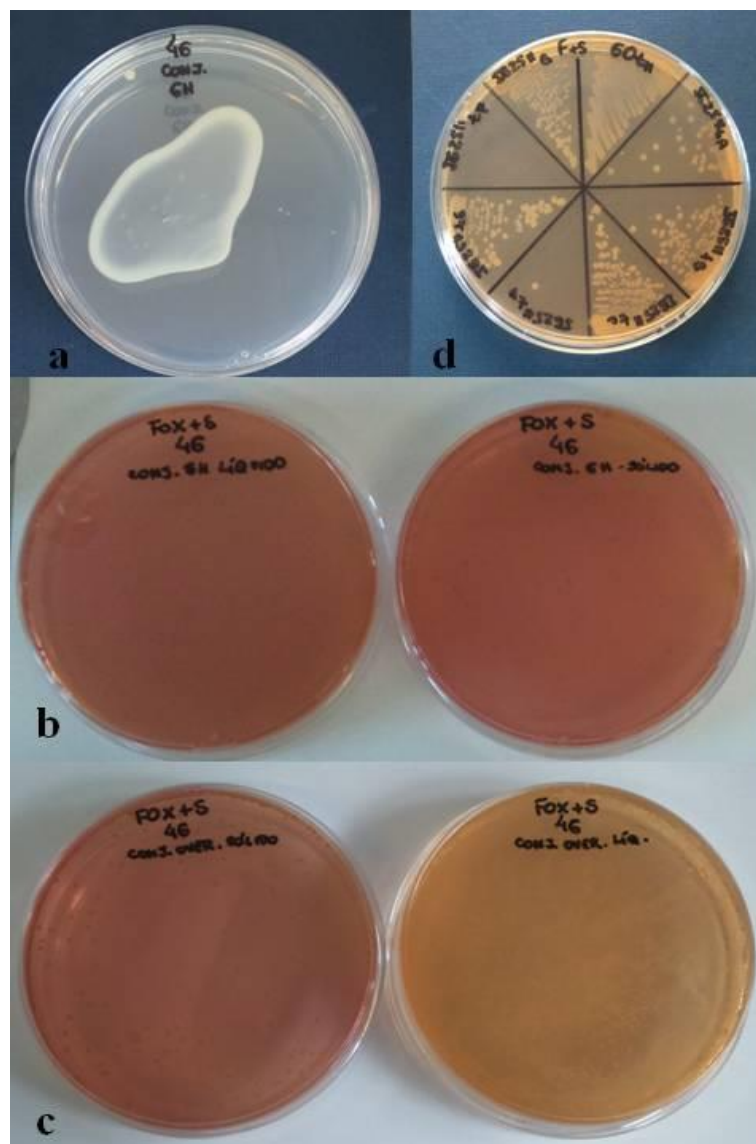


Figura 13. Conjugação em meio sólido e em meio líquido. **a** - crescimento obtido após 6 horas de conjugação, em meio sólido (AMH); **b** – primeiro repique da suspensão obtida da conjugação por 6 horas, em meio sólido e em meio líquido, em AMC com cefoxitina e estreptomicina, observa-se colônias incolores com as características esperadas para transconjugantes; **c** - primeiro repique da suspensão obtida da conjugação por 24 horas, em meio sólido e em meio líquido, em AMC com cefoxitina e estreptomicina, observa-se colônias incolores com as características esperadas para transconjugantes; **d** – segundo repique em meio AMC com cefoxitina e estreptomicina para confirmação das características macroscópicas das colônias obtidas pelos métodos de conjugação.

Houve conjugação em 80% (4/5) das cepas estudadas. Apenas a cepa FFUP11 não originou transconjugantes, porém não se deve à técnica utilizada já que a cepa controle originou transconjugantes em ambos os métodos e em ambos os tempos de conjugação.

As características fenotípicas de resistência das transconjugantes obtidos de ambos os métodos e ambos os tempos foram semelhantes às das bactérias doadoras e os genes de resistência também foram observados nas bactérias transconjugantes (Tabela 5).

Tabela 5. Os perfis fenotípicos e genotípicos das bactérias doadoras e de seus transconjugantes (T) obtidos a partir do método em meio líquido por 6 horas

Cepa	Espécie	Perfil fenotípico de resistência	Perfil genotípico
FFUP4	<i>E. agglomerans</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX - PIP - KF - CXM	-
FFUP4 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	-
FFUP4 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	-
FFUP13	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CIP - SXT - TET - C - F - KF - CXM	<i>ampC</i> - DHA
FFUP13 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i>
FFUP13 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i>
FFUP15	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - PIP - TZP - CIP - SXT - TET - C - F - KF - CXM	<i>ampC</i> - DHA
FFUP15 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i>
FFUP15 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i>
CMY-2	<i>E. coli</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX - PIP - KF	<i>ampC</i> - CIT - CMY
CMY-2 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i> - CIT - CMY
CMY-2 T		AML - AUG - FOX - CAZ - KF	<i>ampC</i> - CIT - CMY

Legenda: AML – amoxicilina, AUG – amoxicilina com ácido clavulânico, C – cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, CTX – cefotaxima, CXM - ceforoxima, F - nitrofurantoína, FEP – cefepime, FOX – cefoxitina, KF – cefalotina, IMI – imipenem, PIP – piperacilina, SXT – sulfa-trimetoprim, TET – tetraciclina, TZP – piperacilina com tazobactam. CMY-2 – cepa previamente caracterizada como produtora de CMY, AmpC plasmidial, usada como controle nos testes; CMY-2 T – transconjugantes obtidas a partir da cepa controle.

Assim, as duas diferentes técnicas de conjugação testadas neste trabalho foram adequadas para o ensaio de conjugação com enterobactérias produtoras de AmpC a fim de confirmar a localização plasmidial dos genes detectados. Dessa forma, selecionou-se a técnica de conjugação em meio líquido por 6 horas para a conjugação das demais cepas por tratar-se de uma técnica fácil e rápida.

O ensaio de conjugação em meio líquido, por 6h, foi realizado para as demais cepas e houve a confirmação da localização plasmidial dos genes codificantes de enzimas AmpC em 38,9% (7/18) das cepas deste estudo. As transconjugantes apresentaram resultados fenotípicos e genotípicos semelhantes às bactérias doadoras (Tabela 6).

Tabela 6. Perfis de resistência e perfis genotípicos das cepas e seus transconjugantes (T)

Cepa	Espécie	Perfil de Resistência	Observação de Zona D	Perfil genotípico
FFUP1	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ – CTX	NÃO	DHA
FFUP2	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG – FOX	SIM	CIT - DHA
FFUP3	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ – CTX	SIM	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP4	<i>Ent. agglomerans</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	-
FFUP4 T		AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	-
FFUP5	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	SIM	<i>ampC</i> - CIT
FFUP5 T		AML - AUG - FOX - CAZ – CTX	NÃO	<i>ampC</i> - CIT
FFUP6	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	<i>ampC</i> - CIT
FFUP7	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	SIM	CIT - DHA
FFUP8	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	SIM	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP9	<i>E. coli</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP9 T		AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP10	<i>P. mirabilis</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX - FEP - IMI	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP10 T		AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - CMY
FFUP11	<i>E. coli</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	<i>ampC</i> - CIT
FFUP12	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	SIM	<i>ampC</i>
FFUP13	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM	<i>ampC</i> - DHA
FFUP13 T		AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	<i>ampC</i>
FFUP14	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP14 T*				
FFUP15	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX - CAZ	SIM	<i>ampC</i> - DHA
FFUP15 T		AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	<i>ampC</i>
FFUP16	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	SIM	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP17	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	NÃO	<i>ampC</i> - CIT - DHA
FFUP17 T*				
FFUP18	<i>K. pneumoniae</i>	AML - AUG - FOX – CAZ	SIM	<i>ampC</i>
FFUP18 T		AML - AUG - FOX - CAZ - CTX	NÃO	<i>ampC</i>

Legenda: AML – amoxicilina, AUG – amoxicilina com ácido clavulânico, FOX – cefoxitina, CTX – cefotaxima, FEP – cefepime, IMI – imipenem. T – cepa transconjugante. * Houve pouco crescimento bacteriano no segundo repique em AMC com antibióticos e não houve crescimento bacteriano no AMH utilizado no teste de suscetibilidade antimicrobiana para confirmação fenotípica de resistência AmpC.

A confirmação da transferência dos genes nessas cepas foi realizada por testes fenotípicos e genotípicos. O teste de inibição da enzima por cloxacilina foi realizado nos transconjugantes obedecendo a metodologia executada para as bactérias doadoras. Como se tratavam de isolados pertencentes à espécie *Escherichia coli*, observou-se o não crescimento bacteriano na placa de AMH com cloxacilina, como já havia sido observado anteriormente. No entanto, não encontramos justificativa para tal fenômeno (Figura 14). Eventualmente, a inibição da enzima levou à formação de halos de diâmetro tão elevados que não se detectou o crescimento bacteriano mas não foi realizado o teste em placa utilizando menos discos para confirmar esta hipótese. Os meios utilizados foram submetidos aos controles positivo e

negativo com cepas controle, e por isso descartou-se problemas referentes ao meio e ao antimicrobiano adicionado.

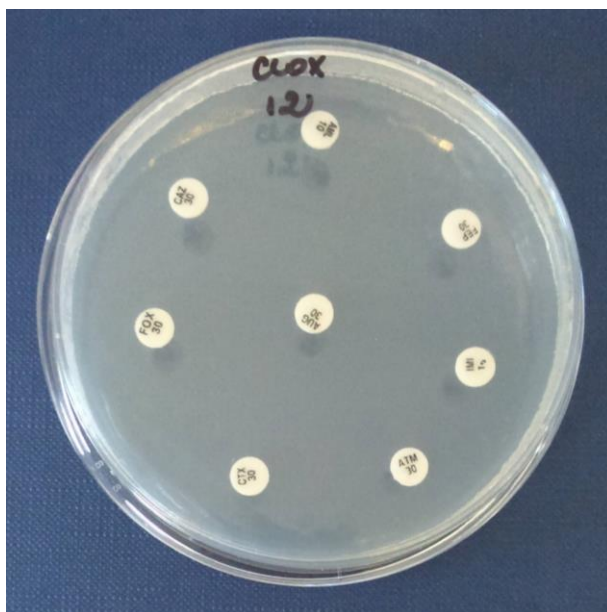


Figura 14. Teste de inibição da AmpC pela cloxacilina em bactérias transconjugantes. Não foi observado o crescimento bacteriano neste teste em todos os transconjugantes obtidos.

Os transconjugantes, em sua maioria (85,7%), tiveram confirmada a produção da enzima AmpC pela metodologia proposta da adição do AB ao disco de cefoxitina. Apenas um isolado, FFUP9 T, não apresentou diferença de halos maior ou igual a 5mm, o ponto de corte para ser considerado produtor da enzima.

A avaliação fenotípica também incluiu a análise de resistência associada à dos β -lactâmicos, tanto nas bactérias doadoras quanto nas transconjugantes. Duas cepas selecionadas, FFUP13 e FFUP15, apresentaram perfil de resistência a outras classes de antimicrobianos, porém nenhum apresentou resistência aos carbapenemas, antimicrobianos de última escolha para tratamento de infecções graves. No entanto, suas transconjugantes não tiveram perfis de resistência relevantes e as resistências a outras classes antimicrobianas observadas nas bactérias doadoras não puderam ser percebidas nas transconjugantes (Tabela 5), com exceção da resistência à cefalotina. A resistência a esta cefalosporina, de primeira geração, era esperada visto a suscetibilidade das cepas às cefalosporinas de segunda e terceira geração. Portanto, acredita-se que não houve transferência de outros genes de resistência além dos codificantes de AmpC.

Os genes que codificam os grupos enzimáticos CIT e CMY foram transferidos aos seus transconjugantes, demonstrando que estes genes estavam localizados em plasmídeos conjugativos. AmpC transferíveis tem sido descritas em todo o mundo e em diversas espécies de enterobactérias, porém o gene transferido depende da região geográfica, de acordo com a epidemiologia local. Na Espanha e na Tunísia, o gene CMY é descrito como um gene presente em plasmídeo conjugativo, e na Coreia foi relatado o gene DHA-1 em plasmídeo conjugativo (Verdet *et al.*, 1998; Aragón *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2011). Porém outras transconjugantes apresentaram apenas amplificação com *ampC*, demonstrando que nesses casos os genes também estão presentes em um plasmídeo conjugativo mas que pertencem a grupos enzimáticos não estudados neste trabalho. As bactérias doadoras que amplificaram

DHA não transferiram tal característica a suas transconjugantes. As enzimas do grupo DHA era codificadas por genes provavelmente presentes em elementos móveis que não foram transferidos durante a conjugação dessas cepas, corroborando com Jones-Dias e colaboradores (2014).

A confirmação da produção da enzima nas cepas e em seus transconjugantes foi feita por focagem isoeletrica, que é uma técnica bastante delicada, a qual necessita de uma quantidade significativa da enzima para sua revelação no gel de focagem isoeletrica.

Com isso, foram feitos 4 ensaios a fim de obter-se um melhor extrato bruto para a focagem isoeletrica. Foram selecionados 10 cepas para cada ensaio, sendo nove enterobactérias oriundas das amostras clínicas e a cepa controle CMY-2 (Tabela 6). Os extratos foram testados com nitrocefina para verificar a presença de β -lactamase e a mudança da coloração amarelada do nitrocefina para a avermelhada pela hidrólise da cefalosporina cromogênica pela β -lactamase presente, essa reação deve ocorrer em tempo menor que 10 segundos para garantir a visualização de banda no gel de focagem (Figura 15).

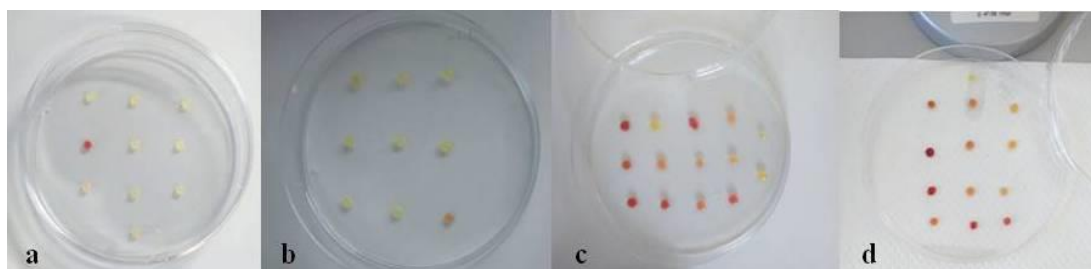


Figura 15. Reação do extrato bruto com nitrocefina. A presença de β -lactamase no extrato causa a hidrólise do anel β -lactâmico da cefalosporina cromogênica e a solução passa a ser avermelhada. Observamos então a força de reação dos extratos obtidos a partir da metodologia utilizando apenas TSB para crescimento das cepas (a), utilizando TSB com cefoxitina (b), TSB com cefoxitina e cefotaxima (c), e incubação em TSB com cefoxitina e cefotaxima por 3 dias consecutivos (d).

O primeiro ensaio foi realizado com os 10 cepas incubados em TSB sem antimicrobiano, ou seja, houve o crescimento da bactéria produtora de AmpC sem pressão seletiva. Nesse ensaio, os extratos brutos apresentaram baixa força de reação com nitrocefina. Em sua maioria, os extratos brutos das cepas crescidas sem pressão mudaram da coloração amarelada para a avermelhada somente 30 segundos após contato com o nitrocefina, mesmo após a sonicação dos extratos enzimáticos. O tempo médio de reação foi de 29,3 segundos, demonstrando que havia uma pequena quantidade da enzima no extrato e provavelmente não seria suficiente para detecção da banda no gel após a focagem isoeletrica e revelação com solução de nitrocefina.

Em busca de um extrato com maior quantidade de enzimas e por consequência, com menor tempo de reação com nitrocefina, foi realizada a extração utilizando TSB com antimicrobiano para propiciar a pressão sobre as bactérias. Utilizou-se um disco de cefoxitina adicionado ao TSB e inoculou-se a cepa, ao final de 24h procedeu-se à metodologia de centrifugação, choque térmico e sonicação, e obteve-se um tempo médio de reação de 34,1 segundos. Novamente, o resultado não foi o esperado para submeter os extratos à focagem isoeletrica.

Outro ensaio foi realizado, também utilizando antimicrobiano no meio de cultivo das cepas. Desta vez, foram adicionados um disco de cefoxitina e um disco de cefotaxima com mesmo objetivo de obter extratos com maior força de reação com nitrocefina para o uso na

focagem isoeletrica. Após a extração enzimática, fez-se o teste com nitrocefina e a média dos tempos de reação foi de 25,7 segundos, um tempo ainda muito acima do esperado.

Por fim, foi realizado um ensaio em que a cepa foi cultivada por 3 dias em TSB com pressão (um disco de cefoxitina e um disco de cefotaxima). Tal metodologia foi desenvolvida baseada no conhecimento da falha na antibioticoterapia com β -lactâmicos em isolados produtores naturais de AmpC, que ocorre após tratamentos prolongados (CLSI, 2014). Assim, durante os 3 dias de incubação, os crescimentos bacterianos foram centrifugados, o sobrenadante descartado juntamente com os discos de antibióticos, e foram repostos o TSB e os discos de cefoxitina e cefotaxima. Ao final, a centrifugação, choque térmico e sonicação foram feitas como nos demais ensaios. Como resultado, a média de reação dos extratos brutos com nitrocefina foi de 14 segundos. A metade dos extratos teve tempo de reação inferior a 10 segundos, como esperado para a utilização no procedimento para confirmação da enzima AmpC.

A focagem isoeletrica foi realizada para detectar β -lactamases AmpC e classificá-las de acordo com os pontos isoeletricos previamente descritos para cada enzima desse grupo. Como controle para a focagem isoeletrica foram utilizadas as cepas: NCTC13451 que possui as enzimas TEM-1, OXA-1 e CTXM-15, e a cepa padrão *E. coli* CMY-2 cuja enzima pertencente ao grupo de enzimas AmpC.

Os extratos com tempo de reação igual ou inferior a 10 segundos, obtidos a partir da extração com dupla pressão por 3 dias, foram utilizados para identificação e classificação das enzimas AmpC, seguindo a metodologia para focagem isoeletrica (Figura 16).

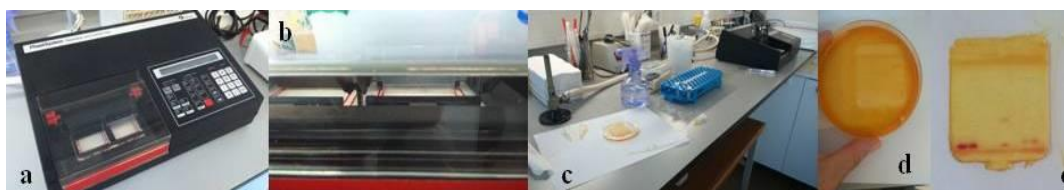


Figura 16. Focagem isoeletrica. **a** – aparelho de focagem isoeletrica utilizado no ensaio deste trabalho; **b** – detalhe do pente, contendo os extratos brutos das cepas analisadas, em contato com o gel de focagem; **c** e **d** – gel de focagem isoeletrica sendo corado com solução de nitrocefina, após o término da corrida no aparelho; **e** – gel de focagem isoeletrica corado com nitrocefina: observa-se 5 bandas ao final do gel, de características alcalinas, provavelmente enzimas do grupo AmpC cujo pI é entre 8 e 9,5.

Após a revelação dos géis com nitrocefina, observou-se uma única banda de pI aproximadamente 9,0, ou seja, um ponto isoeletrico alcalino correspondente ao das enzimas AmpC em 44,5% (8/18) das cepas. Esta banda foi comparada a banda dos extratos padrão NCTC13451 e *E. coli* CMY-2 e foram compatíveis com as bandas de CTX-M-15 (pI 9,0) e CMY-2 (pI 9,0). As enzimas AmpC possuem alto valor de pI, sendo uma enzima com característica alcalina, sendo então observado ao final do gel de focagem isoeletrica. Os pI das enzimas conhecidas variam entre 6,4 (FOX-4) e 9,4 (LAT-1 e LAT-4) (Verdet et al., 1998; Rhimi-Mahjoubi et al., 2002; Jiang et al., 2006; Messai et al., 2006; Power et al., 2006; Kim & Wei, 2007; Yoon et al., 2011; Vingopoulou et al., 2014; Manageiro et al., 2015).

Os transconjugantes também foram submetidos à focagem isoeletrica para confirmação da enzima AmpC e se obteve uma banda de pI 9,0 em 4 das 7 transconjugantes (57,1%).

As cepas FFUP 3,7 e 14, todos identificados como *Klebsiella pneumoniae*, apresentaram pI de aproximadamente 9,0 à focagem isoeletrica. Este pI condiz com o grupo de enzimas AmpC e de acordo com os genes detectados na PCR podemos sugerir que a

enzima em questão é da família CMY, pois o gene CIT codifica enzimas desta família além das LAT-1 a 4 e BIL-1. Outra cepa de mesma espécie teve amplificação apenas de *ampC* e apresentou pI~9,0. Esse fato pode estar relacionado à presença de um gene não pesquisado neste trabalho que também codifica a produção de uma AmpC já que as enzimas deste grupo possuem pI entre 6,4 (FOX-4) e 9,4 (LAT-1 e LAT-4) (Verdet *et al.*, 1998; Rhimi-Mahjoubi *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2006; Messai *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2006; Kim e Wei, 2007; Yoon *et al.*, 2011; Vingopoulou *et al.*, 2014; Manageiro *et al.*, 2015).

Três cepas, pertencentes à espécie *Klebsiella pneumoniae* (FFUP 1,13 e 15), as quais se detectou o gene DHA apresentaram pI superior ao esperado para esta enzima (DHA-1 e DHA-2). O pI para estas enzimas é de aproximadamente 7,8 e a observada neste estudo foi de 9,0. Em duas destas cepas (FFUP 13 e 15) também foi detectado CIT, assim pode-se relacionar o ponto isoelétrico encontrado ao da família CMY. O mesmo ponto isoelétrico e a mesma justificativa pode ser dada para as transconjugantes oriundas das cepas FFUP 13 e 15.

As enzimas CMY associadas aos plasmídeos são comumente encontradas em *Escherichia coli* e neste estudo uma cepa desta espécie amplificaram com os *primers* que conferem a produção desta enzima, CIT e CMY, e à focagem elétrica apresentaram um pI de aproximadamente 9,0 compatível com o destas enzimas (Bortolaia *et al.*, 2014).

Outra enterobactéria deste estudo teve resultados compatíveis com a produção de CMY: *Proteus mirabilis*. Esta cepa apresentou amplificação com CIT, CMY além de *ampC* e houve transferência destas características para a *Escherichia coli* utilizada na conjugação. Porém nem a cepa nem seu transconjugante apresentaram banda no gel de poliacrilamida usado na focagem isoelétrica e portanto não se pode confirmar o pI da enzima. Enzimas desta família, CMY-2 e CMY-4, já foram descritas em *Proteus mirabilis* (Verdet *et al.*, 1998; Aragón *et al.*, 2008).

A partir da padronização das técnicas de detecção de AmpC, que são utilizadas na detecção de ESBL, pode-se dar prosseguimento à confirmação da produção de AmpC das cepas provenientes de leite bovino mastítico. Em momento futuro será sequenciado o gene completo de AmpC para confirmação de mutações que justifiquem os dados obtidos neste estudo, além de confirmar a presença dos genes DHA e CMY nestas cepas.

As 20 enterobactérias de fazendas da região Sul Fluminense, do Rio de Janeiro, provenientes de estudo prévio durante o mestrado da discente (Santiago, 2013) e suspeitas de produzirem AmpC foram enviadas via transportadora para FFUP a fim de dar prosseguimento a avaliação da produção enzimática. Estas cepas foram encaminhadas sob refrigeração para a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), Portugal, considerando todos os requisitos necessários para remessa de material biológico e, os mesmos foram submetidos aos testes realizados e padronizados sob orientação da professora Dra. Helena Neto Ferreira.

No laboratório de bacteriologia da FFUP foram reisolados em ágar Mac Conkey para re-identificação. Treze isolados foram identificados como *Proteus mirabilis*, 3 *Escherichia coli* e 3 *Enterobacter cloacae* e 1 *Serratia rubidaea*. Após a identificação, deu-se início às metodologias fenotípicas de avaliação da produção de AmpC. Primeiramente, realizou-se a difusão em ágar para verificação da resistência à cefoxitina e também análise interpretativa do teste. Ao realizar a leitura do teste, levou-se em consideração que um isolado seria considerado suspeito de produzir AmpC quando tivesse o halo de inibição igual ou menor que 17 milímetros, halo de suscetibilidade intermediária à cefoxitina segundo CLSI (2013, 2014). Assim, quinze isolados foram considerados suspeitos de produzirem a enzima (Tabela 8).

Com relação à interpretação da difusão em ágar, foi avaliada a presença de indução da produção de AmpC. Esta característica é observada em cepas produtoras de AmpC cromossomal indutível demonstrando antagonismo entre os discos de antimicrobianos

utilizados para esta avaliação. Em dez isolados não se observou antagonismo e estes foram suspeitos de produzirem uma AmpC plasmidial (Tabela 7).

A cepa 27, *Escherichia coli*, apresentou perfil de resistência de produtora de AmpC e indução para produção da enzima. Este dado não condiz com a característica de AmpC naturalmente produtora em *E. coli*, pois esta espécie não possui o gene regulador e por isso expressa continuamente a produção de AmpC em baixa quantidade. Contrário ao esperado para *Proteus mirabilis*, foi observada indução em uma cepa deste gênero (23). A presença de um gene plasmidial além do gene cromossomal é possível em *E. coli* e a característica de indução enzimática pode ser devida à presença do gene DHA e seu regulador *ampR* (Bret *et al.*, 1998; Loncaric *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2015; Said *et al.*, 2016).

Tabela 7. Dados referentes à identificação, perfil de resistência, avaliação de antagonismo e amplificação do gene *ampC*

Cepa	Espécie	Perfil de resistência	Observação de Zona D	Deteção de <i>ampC</i>
1	<i>Serratia rubidae</i>	FOX AML AUG	SIM	-
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	FOX AML AUG	SIM	-
3	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML AUG CTX FEP	NÃO	+
4	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML AUG CTX IMI	NÃO	+
8	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX CTX	NÃO	+
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	FOX AML AUG CTX	SIM	-
13	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML CTX IMI	NÃO	+
14	<i>Proteus mirabilis</i>	AML	NÃO	+
17	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML CAZ FEP	NÃO	+
18	<i>Escherichia coli</i>	-	NÃO	+
23	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML AUG	SIM	+
25	<i>Proteus mirabilis</i>	AML IMI	NÃO	+
26	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML ATM IMI	NÃO	+
27	<i>Escherichia coli</i>	FOX AML AUG	SIM	+
28	<i>Proteus mirabilis</i>	AML CTX	NÃO	+
30	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML AUG CTX IMI	NÃO	+
34	<i>Proteus mirabilis</i>	-	NÃO	+
35	<i>Escherichia coli</i>	FOX AUG CTX IMI	NÃO	-
38	<i>Proteus mirabilis</i>	FOX AML AUG CTX IMI	NÃO	-
39	<i>Enterobacter cloacae</i>	FOX AML AUG CAZ CTX ATM	NÃO	-

Legenda: FOX – cefoxitina; AML – amoxicilina, AUG – amoxicilina com ácido clavulânico; CAZ – ceftazidima; CTX- cefotaxima; FEP- cefepime; ATM- aztreonam; IMI- imipenem. O primer utilizado para detecção de *ampC* foi o universal.

Com base nos resultados de suscetibilidade à cefoxitina e antagonismo, 15 cepas foram selecionada para continuação da metodologia proposta e padronizada com os isolados clínicos humanos.

Procedeu-se primeiramente ao teste de inibição com cloxacilina para avaliação da diminuição dos halos e/ou sensibilidade aos antimicrobianos antes ineficazes *in vitro*. As cepas resistentes à cefoxitina não foram inibidas pela cloxacilina. Quanto à inibição da AmpC

pelo ácido borônico, obteve-se a confirmação da produção desta enzima em 25% (5/20) das cepas (Tabela 8). Destas cinco cepas, as 2 e 12 foram negativas no teste de inibição pela cloxacilina.

Tabela 8. Teste de inibição da enzima AmpC pela adição de ácido borônico ao disco de cefoxitina

Cepa	Espécie	Halo cefoxitina	Halo cefoxitina+ácido borônico	Diferença entre os halos	Confirmação de AmpC
1	<i>S. rubidae</i>	16	20	4	NÃO
2	<i>E. cloacae</i>	15	20	5	SIM
3	<i>P. mirabilis</i>	14	16	2	NÃO
4	<i>P. mirabilis</i>	7	17	10	SIM
8	<i>P. mirabilis</i>	17	17	0	NÃO
12	<i>E. cloacae</i>	13	20	7	SIM
13	<i>P. mirabilis</i>	12	18	6	SIM
17	<i>P. mirabilis</i>	11	15	4	NÃO
23	<i>P. mirabilis</i>	16	19	3	NÃO
26	<i>P. mirabilis</i>	20	22	2	NÃO
27	<i>E. coli</i>	20	20	0	NÃO
30	<i>P. mirabilis</i>	14	18	4	NÃO
35	<i>E. coli</i>	20	20	0	NÃO
38	<i>P. mirabilis</i>	16	18	2	NÃO
39	<i>E. cloacae</i>	9	14	5	SIM
CMY-2	<i>E. coli</i>	11	20	9	SIM

Legenda: CMY-2 – cepa padrão utilizada como controle para o ensaio.

Os testes abordados para a detecção de AmpC são sugeridos porém não há concordância em muitos casos, sendo o PCR a técnica padrão ouro para detecção deste mecanismo de resistência (Mata *et al.*, 2010; Sobia *et al.*, 2011; Manoharan *et al.*, 2012). A utilização de várias técnicas fenotípicas garante uma melhor detecção do mecanismo de resistência quando não é possível verificar a presença do gene.

Para confirmação da localização plasmidial do gene AmpC foram realizadas as técnicas de conjugação e PCR multiplex para os grupos enzimáticos plasmidiais.

Nove cepas suspeitas de possuírem uma pAmpC, ou seja, aquelas resistentes à cefoxitina, positivas para o gene *ampC* e que apresentavam ou não indução, visto que há discordância entre autores quanto à validade de afirmar que apenas AmpC cromossomais são induzíveis e pela existência de uma pAmpC induzível (Goldstein, 2002; Jacoby, 2009), foram então submetidas à mesma metodologia de conjugação em meio líquido, padronizada com os isolados clínicos humanos. Destes, em apenas uma cepa (cepa 3), *Proteus mirabilis*, confirmou-se a transferência do gene para a receptora *E. coli* não fermentadora de lactose. Tratando-se de duas cepas não fermentadoras, a confirmação em CHROMagar *orientation* fez-se necessária e demonstrou que as colônias crescidas no meio seletivo realmente pertenciam à bactéria receptora.

Pode-se observar as características da célula doadora e de sua transconjugante na tabela 9. A bactéria doadora e sua transconjugante foram submetidas à difusão em ágar para

análise da resistência adquirida pela passagem do plasmídeo, leitura interpretativa do teste, inibição da enzima pela cloxacilina e pelo ácido borônico, além de PCR para *ampC*, *ampR*, DHA, e PCR multiplex para os grupos de pAmpC. Após a obtenção das transconjugantes, estas e suas doadoras foram submetidas à avaliação de resistência associada ao plasmídeo transferido, ou seja, fez-se o teste de difusão em ágar com outras classes antimicrobianas além dos β -lactâmicos. Na cepa 3 e em seu transconjugante não se observou resistência aos demais antimicrobianos testados.

Tabela 9. Resultados fenotípicos e genotípicos da bactéria doadora, cepa 3, *Proteus mirabilis*, e seu transconjugante (T)

Cepa	Espécie	Halo de FOX	Halo de FOX+AB	Diferença entre os halos	Confirmação de AmpC por inibição com AB	Confirmação de AmpC por inibição com cloxacilina	Perfil de Resistência	<i>ampC</i> universal
3	<i>P. mirabilis</i>	14	16	2	NÃO	NÃO	FOX AML AUG CTX FEP	+
3T	<i>E. coli</i>	16	18	2	NÃO	NÃO	FOX AML AUG	+

Legenda: FOX – cefoxitina; AB – ácido borônico; AML – amoxicilina; AUG – amoxicilina com ácido clavulânico; CTX – cefotaxima; FEP – cefepime. Não houve amplificação com os *primers* para genes AmpC plasmidiais.

A cepa que deu origem à transconjugante apresentava características típicas de ESAC (AmpC de espectro estendido) pela hidrólise da cefalosporina de 4ª geração, o cefepime. No entanto, esta manifestação não foi observada no seu transconjugante. Enterobactérias com perda de porinas ou hiperprodução AmpC podem ser menos suscetíveis a outros β -lactâmicos. Caso se confirmasse a produção de uma ESAC por *Proteus mirabilis*, esta seria a primeira cepa produtora relatada nesta espécie. Esta enzima de espectro estendido só foi relatada em *Escherichia coli* isoladas de humano e animal, e *Enterobacter aerogenes* isolada de humano (Mammeri et al., 2004, 2006, 2008; Bogaerts et al., 2009; Haenni et al., 2014).

Os *primers* AmpC R e AmpC F foram testados após os testes fenotípicos de confirmação das cepas recebidas na instituição FFUP. Os PCR para os genes plasmidiais foram realizados para todas as cepas positivas para *ampC* mesmo aquelas que não apresentavam resistência à cefoxitina e que não passaram o gene para a receptora. Todas as quatorze cepas foram submetidas ao PCR para os genes plasmidiais para descartar a hipótese da existência destes genes em um plasmídeo não conjugativo. Em estudo realizado em outros países, por exemplo, não se obteve sucesso ao transferir o gene DHA-1, sendo a localização deste gene considerada em um elemento móvel diferente e que deve ser melhor estudado (Verdet *et al.* 2006; Mata *et al.*, 2011; Jones-Dias *et al.*, 2014).

Após a revelação do gel de agarose (1,5%), verificou-se a ausência de amplicons referentes aos genes pesquisados. Isso confirma a ausência de transferência da resistência por AmpC, pela conjugação. Possivelmente, as cepas suspeitas de possuírem pAmpC quando realizada a pesquisa em trabalho anterior (Santiago, 2013), tenham perdido o plasmídeo de resistência durante o transporte à FFUP. No caso da cepa que gerou transconjugante a não teve a confirmação pelo PCR para os genes plasmidiais e para DHA, pode ser devido à uma mutação no gene. Acredita-se nesta hipótese uma vez que DHA e CMY são os genes prevalentes em *Proteus* spp. (Leiza *et al.*, 1994; Bret *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010, 2011, 2012; Miró *et al.*, 2012; Treviño *et al.*, 2012; Voets *et al.*, 2012; Hordijk *et al.*, 2013; Reich *et al.*, 2013; Bogaerts *et al.*, 2015).

As quatorze cepas foram submetidas à extração enzimática para utilização na focagem isoelétrica (IEF). A metodologia utilizada foi a incubação com pressão dupla por três dias consecutivos, a técnica mais eficiente para obtenção de enzimas para a focagem conforme análise realizada com os isolados clínicos humanos.

Observou-se que sete cepas (4, 13, 17, 23, 28, 30, 34) tiveram baixo crescimento no meio com antimicrobianos e não foi possível obter um extrato enzimático com tempo de reação com nitrocefim desejável para utilização na IEF. As demais cepas apresentaram bom tempo de reação com o nitrocefim, ficando entre 6 e 11 segundos, inclusive a transconjugante proveniente da cepa 3.

A confirmação da enzima AmpC pelo seu ponto isoelétrico não foi possível devido a um problema técnico no equipamento para realização da IEF, porém os extratos brutos foram armazenados a -80°C para que sejam analisados assim que o problema seja solucionado.

O sequenciamento do gene completo para verificação de possíveis mutações que justifiquem as características fenotípicas e genotípicas observadas nestas cepas e também para classificação da AmpC produzida pela cepa de *Proteus mirabilis* será realizada futuramente, na FFUP.

5.2 Cepas estudadas na UFRRJ: *Escherichia coli* Isolados de Leite Mastítico e Fezes de Rebanhos Bovinos Leiteiros do Brasil

No laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ, foram selecionados 238 cepas de *Escherichia coli* oriundos de amostras de leite e de fezes de vacas leiteiras, de diferentes regiões brasileiras: Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro.

As cepas de *Escherichia coli* foram reativadas e confirmaram-se suas características coloniais em ágar Mac Conkey. Após este procedimento, realizou-se a difusão em ágar para seleção das cepas com diminuída suscetibilidade à cefoxitina e também para avaliar o

antagonismo. No caso, esta observação não era esperada uma vez que não há indução em *E. coli* devido à perda do gene regulador (Pérez-Pérez e Hanson, 2002).

Das 238 cepas de *Escherichia coli*, apenas 28 apresentaram suscetibilidade reduzida à cefoxitina (Tabela 13). O perfil de resistência de cepas suspeitas de produzirem AmpC, resistência à cefamicina, resistência ao inibidor de β -lactamase e sensibilidade à cefalosporina de quarta geração, foi encontrado em 42,8%. Porém em duas cepas, além dessas características, também observou-se resistência ao imipenem, um carbapenema, que é hidrolisado quando há super produção de AmpC constitutiva ou associação de AmpC com perda de porinas (D'Andrea *et al.*, 2006; da Silva Dias *et al.*, 2008; Kim e Wei, 2007; Liebana *et al.*, 2013; Bortolaia *et al.*, 2014). Dentre as cepas, havia suspeitas de produzirem ESBL devido à resistência à amoxicilina e suscetibilidade ao composto associado ao ácido clavulânico, mas todas apresentaram sensibilidade à cefoxitina.

A produção de ESAC é suspeita quando um isolado além de menor suscetibilidade à cefoxitina, apresenta resistência à cefalosporina de quarta geração (Nordmann e Mammeri, 2007; Jacoby, 2009; Martínez-Rojas 2009). Neste estudo foi usado o cefepime como representante desta classe e observou-se resistência a ele em seis cepas (N18, F6, F8, F11, F21, F25) (Tabela 13). As características observadas nestas cepas podem ser devido a inserções, deleções ou mutações em áreas específicas que acarretem a mudança da estrutura enzimática, uma das causas da resistência ao cefepime, ou o envolvimento de outros mecanismos de resistência, como a perda de porinas (Barnaud *et al.*, 2001; Mammeri *et al.*, 2004; Nordmann e Mammeri, 2007).

Estas cepas foram submetidas ao teste de inibição de AmpC por cloxacilina e por ácido borônico, sendo negativos os resultados para ambos os testes. Assim, através destes métodos, não foi possível confirmar a produção da enzima nestas cepas. A inibição por cloxacilina não pode ser observada devido à ausência de crescimento na maioria das cepas; acredita-se que os diâmetros dos halos tornaram-se tão grandes que não puderam ser visualizados nas placas. No caso do ácido borônico, a diferença entre os halos da cefoxitina com e sem ácido borônico foi menor que 5mm, não atingindo o limite para descrição como um produtor de AmpC. Em *Escherichia coli*, produtora natural da enzima pode-se justificar estes dados pela existência de outro mecanismo de resistência como a perda de porinas (Livermore e Woodford, 2006; Rayamajhi *et al.*, 2008; Bortolaia *et al.*, 2014).

Como contraprova fenotípica foram realizados os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) com cefoxitina e com cefoxitina junto ao inibidor cloxacilina. Os testes foram realizados segundo a metodologia descrita no CLSI (2014), padronizando-se o inóculo, pela escala 0,5 de MacFarland, em caldo Infusão de Cérebro e Coração (CBHI) contendo cefoxitina em pó nas diferentes concentrações: 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e para aquelas cepas cuja MIC com cefoxitina foi maior ou igual a 4 foi feito o teste com cefoxitina e o inibidor de AmpC. A concentração de cloxacilina foi constante, de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a de cefoxitina variável: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após incubação a 35°C por 20h foi adicionado 10 μL de resazurina por poço da microplaca de ELISA, as placas foram envoltas em papel alumínio e levadas à estufa onde permaneceram por 30 min. Em seguida, fez-se a leitura dos testes. A resazurina é um corante azul e não fluorescente, quando reduzida pelas células viáveis, torna-se resofurina, de cor rosa e fluorescente, e sem formação de precipitado (Silva, 2009). Este corante facilita a visualização do poço onde houve crescimento bacteriano. A cepa CMY-2 foi utilizada como controle para MIC com cefoxitina e para MIC com cefoxitina e cloxacilina.

O teste com cefoxitina demonstrou que apenas três cepas (10,7%) tiveram MIC igual ou superior a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 17). Considera-se como enterobactéria resistente à cefoxitina

MIC aquela com maior ou igual a 32µg/mL. Dessa forma, não houve confirmação da produção de AmpC nestas cepas uma vez que apenas uma (F6) teve diminuída suscetibilidade ao antimicrobiano e as demais foram sensíveis à ação deste agente antimicrobiano. O controle positivo do teste apresentou MIC maior ou igual a 32µg/mL (Tabela 10).

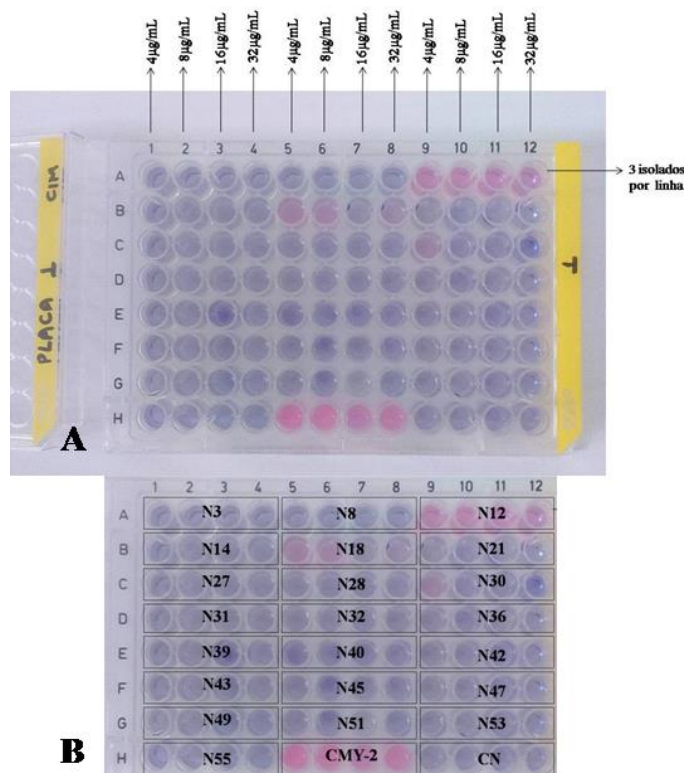


Figura 17. A - Microplaca de ELISA do teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) com cefoxitina após adição de resazurina. As concentrações avaliadas neste teste foram: 4, 8, 16, 32µg/mL. Os poços em cor azul são aqueles em que não houve crescimento bacteriano, e os em rosa onde houve crescimento bacteriano e redução da resazurina. **B** – Modelo da inoculação das cepas na placa de ELISA: na linha H, colunas 5, 6, 7 e 8, encontra-se o teste referente ao controle positivo para AmpC, a cepa CMY-2; na linha H, colunas 9, 10, 11 e 12, encontra-se o controle negativo do teste onde há apenas caldo com as concentrações determinadas de cefoxitina, sem inoculação bacteriana. No total, foram utilizadas seis microplacas, todas incluindo um controle positivo e um negativo, além das cepas estudadas.

Tabela 10. Resultados referentes aos testes fenotípicos empregados na confirmação da produção de AmpC, à extração enzimática e à conjugação, e à detecção por PCR do gene *ampC* nas cepas de *Escherichia coli* com diminuída suscetibilidade à cefoxitina

Cepa	Perfil de Resistência	Inibição por CLOX	Inibição por AB	MIC com FOX (µg/mL)	MIC com FOX+CLOX (µg/mL)	<i>ampC</i>
N18	CFO AMO AMC CPM CTX	ND	ND	8	<4	P
G18	CFO AMO AMC CAZ	ND	ND	<4		P
G27	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
G35	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		N
S10	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
S13	CFO AMO AMC CAZ IPM	ND	ND	<4		N

Tabela 10. Continuação: Resultados referentes aos testes fenotípicos empregados na confirmação da produção de AmpC, à extração enzimática e à conjugação, e à detecção por PCR do gene *ampC* nas cepas de *Escherichia coli* com diminuída suscetibilidade à cefoxitina

Cepa	Perfil de Resistência	Inibição por CLOX	Inibição por AB	MIC com FOX (µg/mL)	MIC com FOX+CLOX (µg/mL)	<i>ampC</i>
S20	CFO	ND	ND	<4		P
S34	CFO AMO	ND	ND	<4		P
S59	CFO	ND	ND	<4		P
S76	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
S77	CFO AMO AMC CAZ CTX IPM	ND	ND	<4		P
S88	CFO	ND	ND	<4		P
S99	CFO AMO AMC CAZ	ND	ND	<4		N
S106	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
S110	CFO CTX	ND	ND	<4		P
S140	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
S141	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		N
S142	CFO IPM	ND	ND	<4		P
S145	CFO	ND	ND	<4		P
F5	CFO	ND	ND	<4		P
F6	CFO CPM	ND	ND	16	<4	P
F8	CFO AMO CPM	ND	ND	<4		P
F11	CFO CPM	ND	ND	<4		N
F12	CFO	ND	ND	4	<4	N
F21	CFO CPM	ND	ND	<4		P
F23	CFO AMO AMC	ND	ND	<4		P
F24	CFO AMO	ND	ND	<4		P
F25	CFO AMO CPM	ND	ND	<4		P
CMY-2	CFO AMO AMC CAZ CTX	P	P	>32 / 128	4	P

Legenda: AB – ácido borônico; FOX – cefoxitina; CLOX – cloxacilina; FOX+CLOX – cefoxitina com cloxacilina; C.P. – cepa controle; CFO – cefoxitina, AMO – amoxicilina, AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, CPM – cefepime, IPM – imipenem, CAZ – ceftazidima, CTX – cefotaxima; ND – não detectado, resultado negativo para o teste em questão; P – resultado positivo para amplificação do gene, usando *primer* não tipo específico (universal).

As três cepas com MIC igual ou maior que 4 µg/mL e o controle positivo foram submetidos ao teste da MIC com cefoxitina e cloxacilina. Não houve crescimento das cepas no meio com cloxacilina. Confirmou-se a inibição da AmpC pela cloxacilina em meio líquido na cepa F6 que apresentou CIM de 16 µg/mL sem inibidor, e na cepa padrão que teve MIC maior ou igual a 32 µg/mL. Para confirmar o crescimento de *Escherichia coli* em CBHI com cloxacilina, todas as cepas foram inoculadas em poço contendo apenas o caldo com 200µg/mL cloxacilina. Isto foi necessário para demonstrar que não houve inibição do crescimento bacteriano pela adição da cloxacilina ao meio.

Embora não se tenha suspeita de cepas produtoras de pAmpC, pois não se observou concordância entre os testes fenotípicos assim como ocorreu na cepa padrão que contém CMY-2 plasmidial, realizou-se a conjugação bacteriana dos 28 cepas com reduzida suscetibilidade à cefoxitina. Após proceder à metodologia de conjugação em meio líquido por 6 horas como padronizado anteriormente, apenas houve crescimento de transconjugantes no meio seletivo – ágar Mac Conkey com cefoxitina e estreptomina – oriundas da cepa padrão.

A fim de confirmar a produção de AmpC através de seu ponto isoelétrico (pI), foi feita a extração da enzima segundo a metodologia também padronizada com os isolados clínicos humanos. Após a incubação das cepas em caldo tripticase de soja (TSB) com dupla pressão por três dias consecutivos, os extratos brutos (EB) foram obtidos e submetidos ao teste de reação com nitrocefina para verificação da qualidade do extrato bruto obtido. Devido à ausência de transconjugantes, apenas as cepas foram submetidas à extração da enzima para confirmação pelo pI. Neste teste, durante a dupla pressão foram utilizados os discos de cefoxitina e cefotaxima, 26 cepas, incluindo quatro resistentes a cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima e/ou cefotaxima), não resultaram em EB pelo não crescimento bacteriano no meio. Tal observação demonstra a produção de AmpC em níveis variáveis e por isso observou-se a diminuída suscetibilidade das cepas à cefoxitina na difusão em ágar, porém sua produção não foi suficiente para permitir o crescimento da cepa em meio com pressão com antimicrobiano.

Os EB de N18 e G18 apresentaram hidrólise do nitrocefina e mudança de coloração em 8s. O tempo ideal para que se possa submeter o EB à focagem isoelétrica (IEF) é inferior a 10s que foi alcançado nestes casos. Porém por problemas já mencionados, a IEF não pode ser realizada e os EB foram congelados à -20°C para serem enviados à FFUP onde serão confirmadas as enzimas produzidas por estas cepas de *Escherichia coli* juntamente com os controles para o ensaio. A cepa controle, positiva para CMY-2, foi também submetida à extração e o EB apresentou tempo de reação igual a 6s, também sendo congelado para posterior análise por IEF.

A fim de concluir a pesquisa das cepas de *Escherichia coli* produtores de AmpC, foi realizado o PCR multiplex considerada a técnica padrão ouro para diferenciar entre AmpC cromossomais e plasmidiais, e também diferenciar dentre os diversos grupos de pAmpC (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Mata *et al.*, 2010). Antes, todas as cepas foram submetidas ao PCR para detecção do gene *ampC* que não diferencia se o gene é cromossomal ou plasmidial. O PCR para *ampC* foi realizado para confirmar a presença do gene nas cepas naturalmente produtores da enzima mas nem todos tiveram amplificação com este *primer*. Em 75,2% (179/238) e em 78,6% (22/28) das cepas com reduzida suscetibilidade à cefoxitina, foi confirmado o gene *ampC*. Em todas as cepas foi feito o PCR multiplex mas não houve amplificação com os 5 *primers* usados nem com os simplex de CMY, DHA e AmpR. A cepa controle utilizada amplificou com os *primers* esperados.

CMY é a pAmpC prevalente em *Escherichia coli* e foram descritas em isolados humanos e animais (Cejas *et al.*, 2002). Esta enzima está descrita em *Escherichia coli* isolados de água, humanos e animais. Dentre os isolados animais, todos foram descritos em aves: corvo e frango (Adler *et al.*, 2008; Simner *et al.*, 2011; Loncaric *et al.*, 2013; Botelho *et al.*, 2015; Mo *et al.*, 2016; Said *et al.*, 2016).

A amplificação de *ampR* está associada ao gene DHA uma pAmpC induzível (Rayamajhi *et al.*, 2008). Embora o gene regulatório *ampR* não esteja presente em *Escherichia coli* já se relatou DHA e *ampR* (Adler *et al.*, 2008; Rayamajhi *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2015). O gene DHA é pouco descrito em *E. coli* e sua transferência *in vitro* não é

observada devido à diferença no elemento móvel que o carrega (Freitas *et al.*, 2014; Jones-Dias *et al.*, 2014).

O PCR multiplex descrito por Pérez-Pérez e Hanson (2002) consegue diferenciar as pAmpC dentre os grupos enzimáticos: ACC, ACT, FOX, LAT, MIR, MOX. Manoharan e colaboradores (2012) relataram as enzimas CIT e FOX, em *Escherichia coli* provenientes de amostras clínicas humanas, na Índia; e FOX e ACC foram descritas em *E. coli* provenientes de amostras clínicas, na Holanda (Voets *et al.*, 2012).

A presença de características fenotípicas de produtor de AmpC com ausência de detecção do gene pode ser devido a mutações neste gene. Com isto, ocorre mudança na expressão genética influenciando a produção da enzima e observação fenotípica desta característica no isolado (Thomson 2001; Cantarelli *et al.*, 2007; Haldorsen *et al.*, 2008).

O sequenciamento da região promotora e codificadora de *ampC* foi realizado em 12 cepas com características e suspeitas distintas a fim de avaliar possíveis mutações e correlacionar ao observado fenotipicamente. No entanto, apenas 6 cepas puderam ser estudadas devido à baixa qualidade no sequenciamento das demais. As características fenotípicas, genotípicas e mutações observadas estão presentes na tabela 11.

O presente trabalho é o primeiro a realizar este estudo, em *Escherichia coli* provenientes de animais de produção no Brasil.

O estudo da sequência do promotor de *ampC* é utilizado para avaliar a presença das mutações que ocasionam super produção da enzima e acarretam resistência à cefoxitina em cepas naturalmente produtoras da enzima (Olsson, 1983; Nelson e Elisha, 1999; Caroff *et al.*, 2000; Philippon *et al.*, 2002; Siu *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2010). Nas cepas deste estudo realizou-se a conjugação e o PCR para os genes plasmidiais e pôde-se descartar a possibilidade de um pAmpC.

Após o sequenciamento da região promotora e atenuadora das cepas, pôde-se observar uma grande variedade de mutações no promotor corroborando com Corvec e colaboradores (2002). Dentre as mutações de importância sempre são citadas na literatura: -42 e -32 que alteram o box -35, inserções que alterem o box -10 e mutações na região promotora: +24 e +58, e estão relacionadas à mudança da força do promotor de *Escherichia coli* relacionada à maior transcrição do gene *ampC* (Olsson *et al.*, 1983; Caroff *et al.*, 1999; Corvec *et al.*, 2002; Fernández-Cuenca *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2010; Haenni *et al.*, 2014). Primeiramente, as regiões conservadas -35 e 10, os boxes importantes da região promotora do gene, foram detectados e a partir de então as análises foram feitas para a confirmação das características fenotípicas observadas anteriormente (Figura 18) (Jaurin e Grundström, 1981). Desta forma sugerimos que a mutação na posição -73 acompanhada de mutações nas posições -88, -82, -18, -1 e +58 podem levar a modificação da transcrição do gene, levando à super produção da enzima.

Tabela 11. Correlação dos resultados fenotípicos, genotípicos e estudo da região promotora e codificadora de *ampC* segundo a suspeita de enzima produzida pelas cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Perfil Fenotípico	Perfil Genotípico	Suspeita Principal	Outro Mecanismo	Mutação na Região Promotora	Mutação na Sequência de Aminoácidos de <i>ampC</i>
G27	AMO, AMC, CFO	AmpC	super produção de AmpC	ND	-88; -82; -73; -18; -1; +58	T8A / K191Q / S209P / A231T / R248C / Q251R / L254M / K255N / L257R / E261D / I298S / D304G / R312H / P316A
S10	AMO, AMC, CFO	AmpC	super produção de AmpC	ND	-88; -82; -73; -18; -1; +58	T8A / S82R / D92E / K191Q / S209P / A231T / R248 / Q251R / L254M / K255N / L257R / E261D / I298S / D304G / R312H / P316A
F8	AMO, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ND	-73	T8A / Q23K / T105A / K191Q / S209P / S252I / I300V / P316A
F25	AMO, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ESBL	-73	T8A / K191Q / S209P / S252I / L270V / I300V / P316A
N18	AMO, AMC, CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ND	-73	T8A / Q23K / T105A / K191Q / S209P / S252I / L270V / I300V / P316A
F21	CFO, CPM	AmpC	ESAC cromossomal	ND	-88; -82; -73; -18; -1; +58	T8A / A130T / K191Q / S209P / A231T / R248C / Q251R / M254M / K255N / P257H / L257R / E261D / I300V / P316A

Legenda: AMO – amoxicilina, AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, CFO – cefoxitina, CPM – cefepime; AmpC – *primer* universal; ESAC – AmpC de Espectro Estendido; ESAC – AmpC de Espectro Estendido; ND – não detectado; ESBL – β -lactamase de Espectro Estendido; Para código dos aminoácidos ver anexo 3.

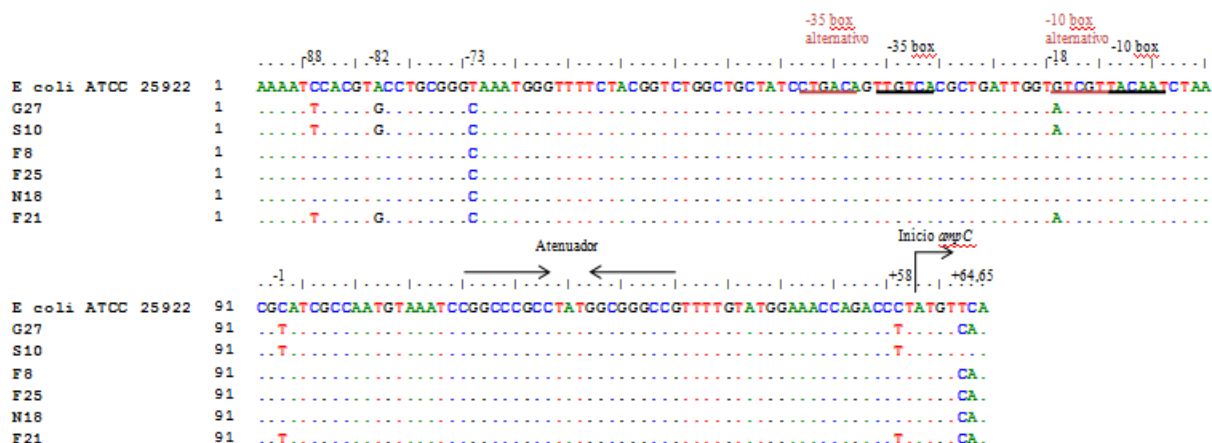


Figura 18. Alinhamento das seqüências da região promotora e atenuadora de *ampC*. Utilizou-se a cepa *E. coli* ATCC 25922 para comparação com as seqüências do gene das cepas em estudo.

Nas cepas estudadas neste trabalho, detectou-se mutação na posição -73. Esta região ainda não foi descrita na literatura como importante para alteração da transcrição do gene que pode ter importância quando associada a outras mutações pois nas cepas F8, F25 e N18, não suspeitas de super produção da enzima, apresentaram mutações na posição -73. Já as cepas G27, S10 e F21 a mutação -73 veio acompanhada de outras já descritas na literatura: -88, -82, -18, -1 e +58. As cepas G27 e S10 apresentavam características fenotípicas de super produtoras de AmpC e compatíveis com os dados obtidos pelo sequenciamento. Contudo, a cepa F21 também apresentou as mutações em promotor e atenuador como em G27 e S10 (Tabela 11) e embora não fosse suspeita desta característica, a presença destas mutações sugerem que além de serem produtores de ESAC também podem superexpressar AmpC.

As mutações em -1 e +58 não são consideradas significantes por Tracz e colaboradores (2007) mas outros autores já descreveram a importância e a ocorrência destas mutações em *Escherichia coli* mesmo sem as mutações -42 e -32 na região promotora (Nelson e Elisha, 1999; Siu et al., 2003; Yu et al., 2009;). Assim como o encontrado neste estudo, foi descrita a substituição de C (citosina) por T (timina) em -58 (Nelson e Elisha, 1999; Siu et al., 2003; Yu et al., 2009).

O gene completo também foi sequenciado, desta vez, para avaliar possíveis mutações que pudessem levar à produção de uma enzima de estrutura menos rígida e por isso com atividade sobre outros β -lactâmicos, como o cefepime (Nordmann e Mammeri, 2007; Jorgensen et al., 2010). Após o alinhamento das seqüências, fez-se uma descrição das regiões de importância para a atividade enzimática, como descrito por Haenni e colaboradores (2014) (Figura 19).

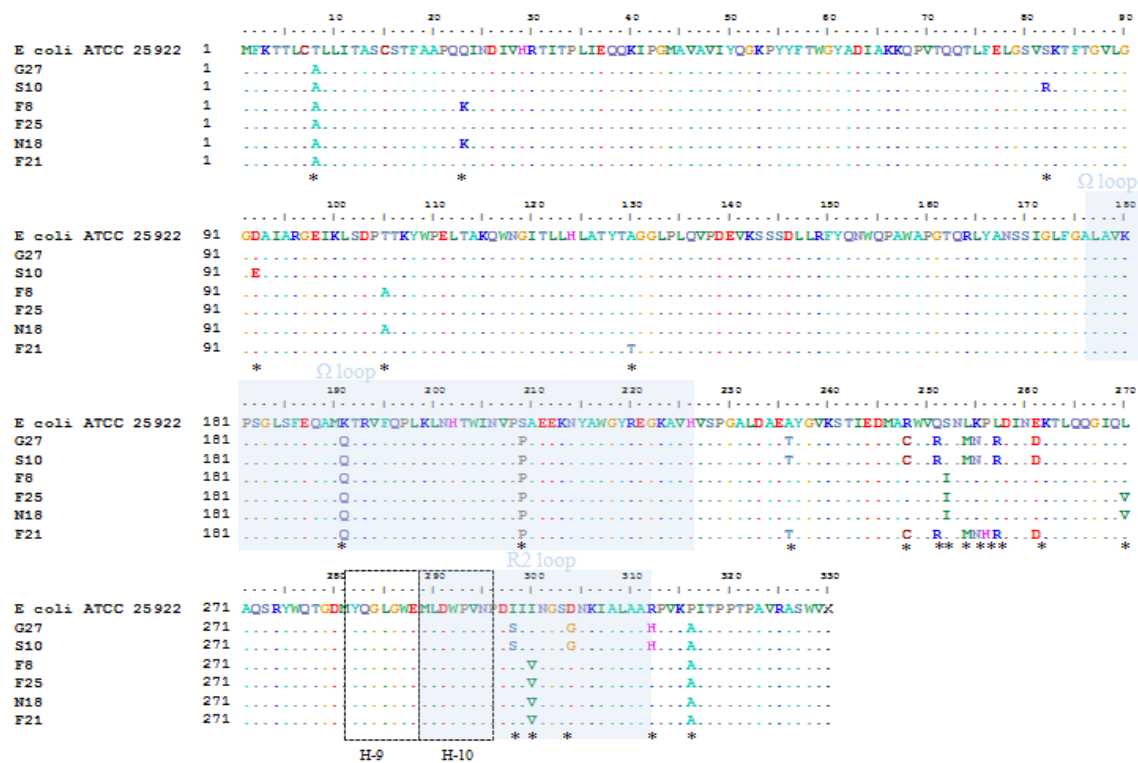


Figura 19. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos cepas estudadas. Utilizou-se a cepa *E. coli* ATCC 25922 como padrão para o alinhamento.

Observaram-se muitos pontos de mutação na sequência da região codificadora das cepas mas grande parte pode-se considerar polimorfismos do gene. As mutações que estão relacionadas à atividade de AmpC descritas na literatura estão contidas nas regiões de ligação com o antimicrobiano: Ω loop, H-9, R2 loop, H-11 (Barnaud et al., 2001; Kim et al., 2006; Mammeri et al., 2007; 2008; Nordmann e Mammeri, 2007; Bogaerts et al., 2009; Haenni et al., 2014; Brown e Livesay, 2015; Pires et al., 2015). Com base nessas descrições, as mutações que ocasionam aumento do espectro de ação da enzima AmpC devem estar localizadas entre 177 e 226 (Ω loop), 282 e 288 (H-9), 289 e 311 (R2 loop) e 346 e 361 (H-11).

As cepas estudadas apresentaram mutações em regiões em que não há interferência na estrutura da enzima (Anexo 2) e houve variações de aminoácidos nas alças Ω e R2, em todas as cepas mesmo naquelas sem suspeita de ESAC (Tabela 11, Figura 19). Todas as cepas (G27, S10, F8, F25, N18, F21) apresentaram em 191 substituição de lisina (K) por glutamina (Q) e em 209, serina (S) por prolina (P) (Anexo 5 – quadro de códigos de aminoácidos, IUPAC). Não há descrito na literatura substituições nestas regiões mas Haenni e colaboradores (2015) descreveram substituições em 89, 194, 215, 220, 232, sem correlacionar à mudança de espectro da enzima. Na região R2 foram observadas as substituições I298S, I300V e D304G, e apenas mudança no aminoácido 298 já foi descrita na literatura, em cepas de *Escherichia coli* provenientes de isolados clínicos humanos (Mammeri et al., 2006). Outras variações de aminoácidos que foram descritas são nas posições 287 (S287N, S287C), 292 (A292V), 296 (H296P), 298 (V298L), 350 (V350F) em *Escherichia coli* isolado humanos e animais (Mammeri et al., 2006; Haenni et al., 2015) e 293 (L293P) em *E. coli* humana (Bogaerts et al., 2009).

As substituições de aminoácidos observadas nas cepas deste estudo estão relacionadas à mudança conformacional da enzima, uma vez que os aminoácidos substituídos têm classificações bioquímicas diferentes das originalmente existentes na enzima e modificam as estruturas secundária, terciária e quaternária. No caso da posição 191, por exemplo, existia um aminoácido carregado positivamente, a Lisina, e foi substituído por um carregado negativamente, a Glutamina. Da mesma forma, observa-se a substituição de um aminoácido hidrofílico por um hidrofóbico, na posição 209, o que ocasiona mudança na estrutura da enzima que antes tinha a Serina voltada para o exterior da enzima e agora conta com uma Prolina localizada mais internamente na enzima. O inverso é observado na posição 298: o aminoácido Isoleucina, antes mais interno, é substituído por um hidrofílico, a Serina. Na posição 300, há substituição de aminoácidos de mesma classe, ambos são hidrofóbicos, Isoleucina e Valina. A posição 304 merece destaque pois o Aspartato é substituído por uma Glicina, o primeiro aminoácido é carregado negativamente e possui radical carboxila, porém o segundo, não tem cadeia lateral e por isso não forma pontes de hidrogênio (Nelson e Cox, 2002; Pratt e Cornely, 2006). As interações entre os aminoácidos são importantes na manutenção da estabilidade da enzima, dessa forma, fica claro que houveram alterações sugestivas da mudança de espectro enzimático após as substituições observadas.

Dessa forma, os dados dessas cepas (G27, S10, F25, N18, F21) sugere produtores de ESAC, embora nem todas tenham demonstrado fenotipicamente, uma vez que as mutações observadas na região codificadora do gene implicam variações de aminoácidos dentro e/ou próximas às regiões Ω loop e R2. Outros mecanismos de resistência também podem interferir na expressão da enzima ou na característica fenotípica observada, como é o caso da cepa F25 suspeito de coproduzir ESBL.

6 CONCLUSÃO

- É necessário o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e detecção dos mecanismos de resistência através de metodologias padronizadas.

- O PCR não deve ser a única técnica utilizada para detecção de um mecanismo de resistência; deve-se associar técnicas fenotípicas, genotípicas e bioquímicas.

- As metodologias utilizadas na detecção de ESBL não são as mesmas para a detecção da enzima AmpC e foram adaptadas na FFUP.

- A detecção de AmpC em isolados de origem humana é mais simples do que em isolados de origem animal.

- Nos isolados de origem humana, detectou-se CMY em *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, e em *Klebsiella pneumoniae*, uma AmpC não caracterizada mas provavelmente uma DHA. O sequenciamento do gene nestas cepas será realizado futuramente para caracterização destas enzimas.

- Em uma cepa de *Proteus mirabilis*, de origem animal, foi detectado uma pAmpC mas sem a sua tipificação. O sequenciamento será realizado a fim de identificar a enzima na cepa e em seu transconjugante.

- Em *Escherichia coli*, de origem animal, detectou-se mutações sugestivas de produção de ESAC e super produção de AmpC, através do seqüenciamento. Esta é a primeira descrição das enzimas em cepas de *E. coli* de origem animal, no Brasil.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P. and CHAIN, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 146:837.
- ADLER, H.; FENNER, L.; WALTER, P.; HOHLER, D.; SCHULTHEISS, E.; OEZCAN, S.; FREI, R. Plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61(2):457-8.
- AL-BAYSSARI, C.; DABOUSSI, F.; HAMZE, M.; ROLAIN, J.M. 2015. Detection of expanded-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. Expert Review of Anti-Infective Therapy 13(9):1139-58.
- ALBRECHTOVA, K.; PAPOUSEK, I.; NYS, H.; PAULY, M.; ANOH, E.; MOSSOUN, A.; DOLEJKA, M.; MASARIKOVA, M.; METZGER, S.; COUACY-HYMAN, E.; AKOUA-KOFFI, C.; WITTIG, R. M.; KLIMES, J.; CIZEK, A.; LEENDERTZ, F. H.; LITERAK, I 2014. Low Rates of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife in Tai National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by Villages with High Prevalence of Multiresistant ESBL-Producing *Escherichia coli* in People and Domestic Animals. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0113548.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25:3389-3402.
- ALVAREZ, M.; TRAN, J. H.; CHOW, N.; JACOBY, G. A. 2004. Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48(2):533-537.
- AM, A-E.; MOHAMED, M.E.; AWADALLAH, M. A. 2009. Potential airborne microbial hazards for workers on dairy and beef cattle farms in Egypt. Veterinaria Italiana 45(2):275-285.
- AMADOR, P. P.; FERNANDES, R. M.; PRUDÊNCIO, M. C.; BARRETO, M. P.; DUARTE, I. M. 2015. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of Class A and Class C β -lactamses. Journal of Environmental Science and Health 50:26-39.
- AMBLER, R. P. 1980. The structure of β -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological 289(1036):321-331.
- AMMENOUCHE, N.; DUPONT, H.; MAMMERI, H. 2014. Characterization of a novel AmpC β -lactamase produced by a carbapenem-resistant *Cedecea davisae* clinical isolate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58(11):6942-5.
- ANDRADE, L. N.; NOVAIS, A.; STEGANI, L.; FERREIRA, J.; RIBEIRO, T.; DARINI, A. L.; PEIXE, L. 2015. High diversity of population structure, virulence factors and mobile genetic elements in CTX-M-, SHV- and CMY-producing extraintestinal *Escherichia coli* isolates from large hospitals in Brazil. ECCMID, Copenhagen, Dinamarca.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Nº 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)> Acessado em 20/06/13.
- ARAGÓN, L.M.; MIRELIS, B.; MIRÓ, MATA, C.; GÓMEZ, C.; RIVERA, A.; COLL, P.; NAVARRO, F. 2008. Increase in β -lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M-

and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61:1029–1032.

AZIMI, L.; ERAJIYAN, G.; TALEBI, M.; OWILIA, P.; BINA, M.; SHOJAIE, A.; LARI, A. R. 2015. Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC among Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Different Hospitals in Tehran. Journal of Clinical and Diagnostic Research 9(4): DC01-DC03.

BALAKRISHNAN, S.; ANTONY, P. X.; MUKHOPADHYAY, H. K.; PILLAI, R. M.; THANISLASS, J.; PADMANABAN, V.; SRINIVAS, M. V. 2016. Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* associated with bovine mastitis in India. Veterinary World 9(7):705-9.

BARNAUD, G.; LABIA, R.; RASKINE, L.; PORS, M. J. S.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. 2001. Extension of resistance to cefepime and cefpirome associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. FEMS Microbiology Letters 195:185-190.

BARLOW, M. ; HALL, B.G. 2002. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(5):1190-1198.

BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCHWEIGHART, S. 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 17(5):316-321.

BAUERNFEIND, A.; STEPLINGER, I.; JUNGWIRTH, T.; ERNST, S.; CASELLAS, J. M. 1996. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40(2):509-513.

BERRAZEG M, JEANNOT K, NTSOGO ENGUÉNÉ VY, BROUTIN I, LOEFFERT S, FOURNIER D, PLÉSIAT P. 2015. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:6248–6255.

BIANCHINI, V.; BORELLA, L.; BENEDETTI, V.; PARISI, A.; MICCOLUPO, A.; SANTORO, E.; RECORDATI, C.; LUINIA, M. 2014. Prevalence in Bulk Tank Milk and Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Dairy Herds in Northern Italy. Applied and Environmental Microbiology 80(6):1832–1837.

BLACK, J. A.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. 2005. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC β -lactamases. Journal of Clinical Microbiology 43(7):3110-3113.

BOBROWSKI, M. ; MATTHEW, G.; BARTH, P. T.; DATTA, N.; GRINTER, N. J.; JACOB, A. E.; KONTOMICHALOU, P.; DALE, J. W.; SMITH, J. T. 1976. Plasmid-Determined β -Lactamase Indistinguishable from the Chromosomal β -Lactamase of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 125(1):149-157.

BOGAERTS, P.; HUANG, T.-D.; BOUCHAHROUF, W.; BAURAING, C.; BERHIN, C.; GARCH, F. E.; GLUPCZYNSKI, Y.; COMPATH STUDY GROUP. 2015. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. Microbial Drug Resistance 21(6):643-50.

BÖRJESSON, S.; EGERVÄM, M.; LINDBLAD, M.; ENGLUND, S. 2013. High occurrence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and transferable AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. Applied Environmental Microbiology 79(7): 2463–2466.

BORTOLAIA, V., HANSEN, K. H.; NIELSEN, C. A.; FRITSCHKE, T. R.; GUARDABASSI, L. 2014. High diversity of plasmids harbouring *bla*CMY-2 among clinical *Escherichia coli*

isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 69: 1492–1496.

BOTELHO, L. A. B.; KRAYCHETE, G. B.; COSTA E SILVA, J. L.; REGIS, D. V. V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; BONELLI, R. R. 2015. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110(2): 249-254.

BRADFORD, P. A.; URBAN, C.; MARIANO, N.; PROJAN, S. J.; RAHAL, J. J.; BUSH, K. 1997. Imipenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Is Associated with the Combination of ACT-1, a Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase, and the Loss of an Outer Membrane Protein. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41(3):563-569.

BRET, L.; CHANAL-CLARIS, C.; SIROT, D.; CHAIBI, E. B.; LABIA, R.; SIROT, J. 1998. Chromosomally Encoded AmpC-Type β -Lactamase in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(5):1110-1114.

BRINÁS, L.; ZARAZAGA, M.; SAENZ, Y.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. 2002. β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(10):3156-3163.

BROWN, J. R. e LIVESAY, D. R. 2015. Flexibility correlation between active site regions is conserved across four AmpC β -lactamases enzymes. PLoS ONE 10(5): e0125832.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39(6):1211-1233.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(3):969-976.

CAINE, L-A.; NWODO, U. U.; OKOH, A. I.; NDIP, R. N.; GREEN, E. 2014. Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Raw Cow's Milk from Two Commercial Dairy Farms in the Eastern Cape Province, South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health 11(11): 11950–11963.

CANTARELLI, V. V.; INAMINE, R.; BRODT, T. C. Z.; SECCHI, C.; CAVALCANTE, B. C.; PEREIRA, F. S. 2007. Utility of the Ceftazidime-Imipenem Antagonism Test (CIAT) to Detect and Confirm the Presence of Inducible AmpC β -Lactamases Among Enterobacteriaceae. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 11(2):237-239.

CALTAGIRONE, M.; BITAR, I.; PIAZZA, A.; SPALLA, M.; NUCLEO, E.; NAVARA, A.; MIGLIAVACCA, R. 2015. Detection of na IncA/C plasmid encoding VIM-4 and CMY-4 β -lactamases in *Klebsiella oxytoca* and *Citrobacter koseri* from na impatient cardiac rehabilitation unit. New Microbiologica 38: 387-392.

CAROFF, N.; ESPAZE, E.; GAUTREAU, D.; RICHEL, H.; REYNAUD, A. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45:783-788.

CARVALHO, L.A. Embrapa gado de leite: sistema de produção. Disponível na internet. www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/cerrado.html. Acesso em 16 set. 2009.

CASPERMEYER, J. 2016. MEGA Evolutionary Software re-Engineered to Handle Today's Big Data Demands. Mol. Biol. Evol. 33 (7): 1887.

CEJAS, D.; CANIFIA, L. F.; QUINTEROS, M.; GIOVANAKIS, M.; VAY, C.; LASCIALANDARE, S.; MUTTI, D.; PAGNIEZ, G.; ALMUZARA, M.; GUTKIND, G.; RADICE, M. 2012. Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers. Revista Argentina de Microbiología 44: 182-186.

CIORBA, V.; Odone, A.; VERONESI, L.; PASQUARELLA, C.; SIGNORELLI, C. 2015. Antibiotic resistance as a major public health concern: epidemiology and economic impact. Annali di Igiene: medicina preventiva e di comunità. 27(3):562-579.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nature Chemical Biology 3(9):541-8.

CLSI 2014 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informal Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement – fourth edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CONCEIÇÃO, T.; FARIA, N.; LITO, L.; CRISTINO, J. M.; SALGADO, M. J.; DUARTE, A. 2004. Diversity of chromosomal AmpC β -lactamases from *Enterobacter cloacae* isolates in a Portuguese hospital. FEMS Microbiology Letters 230:197-202.

CORVEC, S.; CAROFF, N.; ESPAZE, E.; MARRAILLAC, J.; REYNAUD, A. 2002. -11 Mutation in the *ampC* Promoter Increasing Resistance to β -Lactams in a Clinical *Escherichia coli* Strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(10):3265-3267.

COTTELL, J. L.; SAW, H. T. H.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. 2014. Functional genomics to identify the factors contributing to successful persistence and global spread of an antibiotic resistance plasmid. BMC Microbiology 14:1-8.

COUDRON, P. E. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated *AmpC* β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. Journal of Clinical Microbiology 43(8):4163–4167.

DAEF, E. A. e ELSHERBINY, N. M. 2012. Clinical and Microbiological Profile of Nosocomial Infections in Adult Intensive Care Units at Assiut University Hospitals, Egypt. Journal of American Science 8(12):1239-1250.

DAHYOT, S.; BROUTIN, I.; CHAMPS, C.; GUILLON, H.; MAMMERI, H. 2013. Contribution of asparagine 346 residue to the carbapenemase activity of CMY-2 β -lactamase. FEMS Microbiology Letters 345:147–153.

DALLENNE, C.; COSTA, A.; DECRE, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65:490-495.

D'ANDREA, M. M.; NUCLEO, E.; LUZZARO, F.; GIANI, T.; MIGLIAVACCA, R.; VAILATI, F.; KROUMOVA, V.; PAGANI, L.; ROSSOLINI, G. M. 2006. CMY-16, a Novel Acquired AmpC-Type β -Lactamase of the CMY/LAT Lineage in Multifocal Monophyletic Isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(2):618–624.

da SILVA DIAS, R.C.; BORGES-NETO, A. A.; D'ALMEIDA FERRAIUOLI, G. I.; de-OLIVEIRA, M. P.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B.M. 2008. Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 60(1):79-87.

DAVID, L. e PATERSON, M. D. 2006. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medicine 119(6A):S20–S28.

DIAS, R. C. S.; BORGES-NETO, A. A.; FERRAIUOLI, G. I. D.; de-OLIVEIRA, M. P.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. 2008. Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 60(1): 79–87.

DIAS, D. J. A. 2009. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo. Dissertação (Genética Molecular e Biomedicina). Universidade Nova de Lisboa.

DIERIKX, C. M.; van der GOOT, J. A.; SMITH, H. E.; KANT, A.; MEVIUS, D.J. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. PLoS One 8(11):e79005.

DING, H.; YANG, Y.; LU, Q.; WANG, Y.; CHEN, Y.; DENG, L.; WANG, A.; DENG, Q.; ZHANG, H.; WANG, C.; LIU, L.; XU, X.; WANG, L.; SHEN, X. 2008. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 27(10):915-21.

DEUTSCH R. F.; ROSS, J. W.; NAILOR, M. D. 2015. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Case Series of Infections at Hartford Hospital. Connecticut Medicine 79 (5):269-275.

DUNNE, W. M. Jr e HARDIN, D. J. 2005. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. Journal of Clinical Microbiology 43(12):5945-9.

DUSE, A.; WALLER, K. P.; EMANUELSON, U.; UNNERSTAD, H. E.; PERSSON, Y.; BENGTOSSON, B. 2015. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. Journal of Dairy Science 98 :500–516.

EGERVÄRN, M.; BÖRJESSON, S.; BYFORS, S.; FINN, M.; KAIPE, C; ENGLUND, S.; LINDBLAD, M. 2014. *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases or transferable AmpC β -lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. International Journal of Food Microbiology 171:8-14.

FENG, Y.; YANG, P.; XIE, Y.; WANG, X.; McNALLY, A.; ZONG, Z. 2015. *Escherichia coli* of sequence type 3835 carrying bla NDM-1, bla CTX-M-15, bla CMY-42 and bla SHV-12. Scientific Report 5:12275.

FÉRIA, C.; FERREIRA, E.; CORREIA, J. D.; GONÇALVES, J.; CANIÇA, M. 2002. Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49:77-85.

FERNANDES, M. R.; McCULLOCH, J.A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. 2016. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a Human Infection in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy doi:10.1128/AAC.01325-16.

FERREIRA, M. R. A.; FREITAS FILHO, E. G.; PINTO, J. F. N.; DIAS, M.; MOREIRA, C. N. 2014. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. Tropical Animal Health and Production.46(4):635-9.

FLEMING, A. 1929. On the antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. British Journal of Experimental Pathology 10:226-236.

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology 13(5): 269-284.

FREITAS, F.; MACHADO, E.; RIBEIRO, T. G.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. 2014. Long-term dissemination of acquired AmpC β -lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 33:551–558.

GARCÍA-COBOS, S.; KOCK, R.; MELLMANN, A.; FRENZEL, J.; FRIEDRICH, A. W.; ROSSEN, J. W. A. 2015. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. PLoS One 10(7):e0134533.

GASPAR, G. G.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L.; MARTINEZ, R. 2015. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(4):483-487.

GHAROUT-SAIT, A.; TOUATI, A.; GUILLARD, T.; BRASME, L.; de CHAMPS, C. 2015. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 19(2):187-95.

GHATAK, S.; SINGHA, A.; SEM, A.; GUHA, C.; AHUJA, A.; BHATTACHARJEE, U.; DAS, S.; PRADHAN, N. R.; PURO, K.; JANA, C.; DEY, T. K.; PRASHANTKUMAR, K. L.; DAS, A.; SHAKUNTALA, I.; BISWAS, U.; JANA, P. S. 2013. Detection of New Delhi Metallo- β -Lactamase and Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in *Escherichia coli* Isolated from Mastitic Milk Samples. Transboundary and Emerging Diseases 60(5):385–389.

GIACOMETTI, F.; BONILAURI, P.; SERRAINO, A.; PELI, A.; AMATISTE, S.; ARRIGONI, N.; BIANCHI, M.; BILEI, S.; CASCONI, G.; COMIN, D.; DAMINELLI, P.; DECASTELLI, L.; FUSTINI, M.; MION, R.; PETRUZZELLI, A.; ROSMINI, R.; RUGNA, G.; TAMBA, M.; TONUCCI, F.; BOLZONI, G. 2013. Four-Year Monitoring of Foodborne Pathogens in Raw Milk Sold by Vending Machines in Italy. Journal of Food Protection 11:1824-1993.

GOLDSTEIN, F. W. 2002. Cephalosporinase induction and cephalosporin resistance: a longstanding misinterpretation. Clinical Microbiology and Infection 8(12):823-5.

GONÇALVES, D. F. M. 2008. β -lactamases de espectro alargado em Enterobacteriaceae da flora fecal de idosos. Dissertação. Universidade de Aveiro.

GONÇALVES, D. F. M. 2013. *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBL's às Carbapenemases, colonização fecal e infeção – Influência da população idosa numa região do Norte de Portugal. Tese. Universidade do Porto.

GUÉRIN, F.; ISNARD, C.; CATTOIR, V.; GLARD, J.C. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59(12):7753-7761.

HAENNI, M.; CHÂTRE, P.; MADEC, J. 2014. Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC β -lactamases (ESAC) in animals. Front Microbiol. 5.

HALDORSEN, B.; AASNAES, B.; DAHL, K. H.; HANSSSEN, A.-M.; SIMONSEN, G. S.; WALSH, T. R.; SUNDSFJORD, A.; LUNDBLAD, E. W. 2008. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62:694–702.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.

HAMMERUM, A. M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, V. D.; LESTER, C. H.; SKYTTE, T. S. S.; HANSEN, F.; OLSEN, S. S.; MORDHORST, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M.; AGERS, Y. 2014. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 7: 1-8.

HANSON, N.D. e SANDERS, C.C. 1999. Regulation of Inducible AmpC β -lactamase Expression Among Enterobacteriaceae. Current Pharmaceutical Design 5:881-894.

HERNÁNDEZ, J. R.; CONEJO, M. C.; PASCUAL, A. 2010. Actividad comparativa del ertapenem frente a *Klebsiella pneumoniae* productor de betalactamasas de espectro extendido o β -lactamasas de AmpC plasmídicas: efecto inóculo y papel de la pérdida de porinas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 28(1):27–30.

HERRERO-FRESNO, A.; LARSEN, I.; OLSEN, J. E. 2015. Genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* from nursery pigs in intensive pig production in Denmark and molecular characterization of genetically different strains. Journal of Applied Microbiology 119(2):342-353.

HOFFMANN, S. A.; PIERETTI, G.G.; FIORINI, A.; PATUSSI, E. V.; CARDOSO, R. F.; MIKCHA, J. M. G. 2014. Genes and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Pasteurized Cow Milk in Brazil. Journal of Food Science 79(6):M1175–M1180.

HOGARDT, M.; PROBA, P.; MISCHLER, D.; CUNY, C.; KEMPF, V. A.; HEUDORF, U. 2015. Current prevalence of multidrug-resistant organisms in long-term care facilities in the Rhine-Main district, Germany, 2013. Euro Surveill 20(26):pii=21171.

HOMMA, T.; NUXOLL, A.; GANDT, A. B.; EBNER, P.; ENGELS, I.; SCHNEIDER, T.; GÖTZ, F.; LEWIS, K.; CONLON, B. P. 2016. Dual Targeting of Cell Wall Precursors by Teixobactin Leads to Cell Lysis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60(11):6510-6517.

HONORÉ, N.; NICOLAS, M. H.; COLE, S. T. 1986. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. The EMBO Journal 5(13):3709-3714.

HORDIJK, J.; SCHOORMANS, A.; KWAKEMAAK, M.; DUIM, B.; BROENS, E.; DIERIKX, C.; MEVIUS, D.; WAGENAAR, J. A. 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. Frontiers in Microbiology 4: 242.

HSIEH, W.-S.; WANG, N.-Y.; FENG, J.-A.; WENG, L.-C.; WU, H.-H. Identification of DHA-23, a novel plasmid-mediated and inducible AmpC β -lactamase from Enterobacteriaceae in Northern Taiwan. Frontiers in Microbiology 6:436.

HUSICKOVA, V.; CEKANOVA, L.; CHROMA, M.; HTOUTOU-SEDLAKOVA, M.; HRICOVA, K.; KOLAR, M. 2012. Carriage of ESBL- and AmpC-positive Enterobacteriaceae in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic 156(4):348–353.

HUJER, A. M.; PAGE, M. G. P.; HELFAND, M. S.; YEISER, B.; BONOMO, R. A. 2002. Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting and Quantifying CM-2 and SHV- β -Lactamases. Journal of Clinical Microbiology 40(6):1947-1957.

IABADENE, H.; MESSAI, Y.; AMMARI, H.; ALOUACHE, S.; VERDET, C.; BAKOUR, R.; ARLET, G. 2009. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Internacional Journal of Antimicrobial Agents 34(4):340-2.

IBRAHIMAGIC, A.; BEDENIC, B.; KAMBEROVIC, F.; UZONOVIC, S. 2015. High prevalence of CTX-M-15 and first report of CTX-M-3, CTX-M-22, CTX-M-28 and plasmid-mediated AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings. Journal of Infection and Chemotherapy 21, p.363-369.

ILLIAQUER, M.; CAROFF, N.; BÉRNER, P.; AUBIN, G. G.; JUVIN, M.-E.; LEPelletier, D.; REYNAUD, A.; CORVEC, S. 2012. Occurrence and molecular

characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST37 clinical isolates producing plasmid-mediated AmpC recovered over a 3-year period. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74: 95–97.

INGT, B.; LASKAR, M. A.; CHOUDHURY, S.; MAURYA, A. P.; PAUL, D.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, M. D.; DHAR, D.; CHAKRAVARTY, A.; BHATTACHARJEE, A. 2017. Molecular and in silico analysis of a new plasmid-mediated AmpC β -lactamase (CMH-2) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 48:34-39.

JACOBY, G.A. e TRAN, J. 1999. Sequence of the MIR-1 β -Lactamase Gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(7):1759-1760.

JACOBY, G. A. 2009. AmpC β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews 22(1):161-182.

JAURIN, B. e GRUNDSTROM, T. 1981. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from tha of β -lactamases of the penicillinase type. Proceedings of the National Academy of Science USA 78(8):4897-49901.

JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, M.; ZHOU, D.; RUAN, F.; LU, Y. 2006. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(9):2990–2995.

JIN, K. ; SAM, L. H.; PO, K. H. L.; LIN, D.; ZADEH, E. H. G.; CHEN, S.; YAN, Y.; LI, X. 2016. Total synthesis of teixobactin. Nature. Communications 7:12394.

JONES, C. H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P. A. 2009. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53(2):465-475.

JONES-DIAS, D.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; LOURO, D.; ANTIBIOTIC RESISTANCE SURVEILLANCE PROGRAM IN PORTUGAL (ARSIP) PARTICIPANTS; CANIÇA, M. 2014. Diversity of Extended-Spectrum and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Portuguese Health Care Facilities. Journal of Microbiology 52(6):496–503.

JORGENSEN, R. L.; NIELSEN, J. B.; FRIIS-MOLLER, A.; FJELDSOE-NIELSEN, H.; SCHONNING, K. 2010. Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. Antimicrobial Chemotherapy 65: 460–464.

KAMEYAMA, M.; YABATA, J.; NOMURA, Y.; TOMINAGA, K. 2015. Detection of CMY-2 AmpC β -lactamase-producing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak strains in a nursery school in Japan. Journal of Infection and Chemotherapy 21(7):544-546.

KANG, H. Y.; KIM, J.; SEOL, S. Y.; LEE, Y. C.; LEE, J. C.; CHO, D. T. 2009. Characterization of conjugative plasmids carrying antibiotic resistance genes encoding 16S rRNA methylase, extended-spectrum β -lactamase, and/or plasmid-mediated AmpC β -lactamase. Journal of Microbiology 47(1):68-75.

KAO, C.-C.; LIU, M.-F.; LIN, C.-F.; HUANG, Y.-C.; LIU, P.-Y.; CHANG, C.-W.; SHI, Z.-Y. 2010. Antimicrobial Susceptibility and Multiplex PCR Screening of *AmpC* Genes From Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 43(3):180–187.

KATEREGGA, J. N.; KANTUME, R.; ATUHAIRE, C.; LUBOWA, M. N.; NDUKUI, J. G. 2015. Phenotypic expression and prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in samples collected from patients in various wards of Mulago Hospital, Uganda. BMC Pharmacology and Toxicology 16(14):1-6.

KIM, S.-H.; WEI, C. –I. 2007. Expression of AmpC β -lactamase in *Enterobacter cloacae* isolated from retail ground beef, cattle farm and processing facilities. Journal of Applied Microbiology 103:400–408.

KIM, J. Y.; JUNG, H. I.; AN, Y, H. et al. 2006. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. Molecular Microbiology 60(4):907–916.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 11(6):315-7.

KONEMAN, W.E.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, JR.W.C. As Enterobacteriaceae. In: KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.263-329, 2012.

LALAK, A.; WASYL, D.; ZAJAC, M.; SKARZYNSKA, M.; HOSZOWSKI, A.; SAMCIK, I.; WOZNIAKOWSKI, G.; SZULOWSKI, K. 2016. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. Veterinary Microbiology pii:S0378-1135(16)30023-2.

LEIMBACH, A.; POEHLEIN, A.; WITTEN, A.; WELLNITZ, O.; SHPIGEL, N.; PETZL, W.; ZERBE, H.; DANIEL, R.; DOBRINDT, U. 2016. Whole-Genome Draft Sequences of Six Commensal Fecal and Six Mastitis-Associated *Escherichia coli* Strains of Bovine Origin. Genome Announcements 4(4):pii: e00753-16.

LEIZA, M. G.; PEREZ-DIAZ, J.C.; AYALA, J.; CASELLAS, J. M.; MARTINEZ-BELTRAN, J.; BUSH, K.; BAQUERO, F. 1994. Gene Sequence and Biochemical Characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-Type Plasmid-Mediated 1-Lactamase with Two Molecular Variants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38(9): 2150-2157.

LI, Y.; LI, Q.; DU, Y.; JIANG, X.; TANG, J.; WANG, J.; LI, G.; JIANG, Y. 2008. Prevalence of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in a Chinese University Hospital from 2003 to 2005: First Report of CMY-2-Type AmpC β -Lactamase Resistance in China. Journal of Clinical Microbiology 46(4): 1317–1321.

LIEBANA, E.; BATCHELOR, M.; HOPKINS, K.L.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; TEALE, C. J.; FOSTER, A.; BARKER, L.; THRELFALL, E. J.; DAVIES, R. H. 2006. Longitudinal Farm Study of Extended-Spectrum β -Lactamase-Mediated Resistance. Journal of Clinical Microbiology 1630-1634.

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T. M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SCHURPBACH-REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. 2013. Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. Clinical Infectious Diseases 56(7):1030-1037.

LING, L.L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A.J. et al., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 517:455- 359.

LIU, Y.-Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R. et al. 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infectious Diseases 16(2):161-8.

LIVERMORE, D. M. e WOODFORD, N. 2006. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. TRENDS in Microbiology 14(9):413-420.

LONCARIC I.; STALDER G.L.; MEHINAGIC K.; ROSENGARTEN R.; HOELZL F.; et al. 2013. Comparison of ESBL – And AmpC Producing Enterobacteriaceae and Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Migratory and Resident Population of Rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. PLoS ONE 8(12): e84048.

LUNA, C. M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GUZMÁN-BLANCO, M. 2014. Review Article – Gram-Negative Infections in Adult Intensive Care Units of Latin America and the Caribbean. Critical Care Research and Practice Article ID 480463, 12 pages.

MALEKI, A. 2015. High Prevalence of AmpC β -Lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Ilam, Iran. Osong Public Health and Research Perspectives (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2015.02.001>

MAMMERI, H.; NAZIC, H.; NAAS, T.; POIREL, L.; LÉOTARD, S.; NORDMANN, P. 2004. AmpC β -Lactamase in an *Escherichia coli* Clinical Isolate Confers Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48(10):4050–4053.

MAMMERI, H.; POIREL, L.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. 2006. Naturally Occurring Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(7):2573-2576.

MAMMERI, H.; POIREL, L.; NORDMANN, P. 2007. Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC β -lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60:490–494.

MAMMERI, H.; NORDMANN, P.; BERKANI, A.; EB, F. 2008. Contribution of extended-spectrum AmpC(ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 282:238–240.

MANN, C.M. e MARKHAM, J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal Applied Microbiology 84:538-544.

MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; PINTO, M.; FONSECA, F.; FERREIRA, M.; BONNET, R.; CANIÇA, M. 2015. Two novel CMY-2-type β -lactamases encountered in clinical *Escherichia coli* isolates. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 14:12.

MANOHARAN, A.; SUGUMAR, M.; KUMAR, A.; JOSE, H.; MATHAI, D.; ICMR-ESBL STUDY GROUP. 2012. Phenotypic & molecular characterization of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. & *Enterobacter* spp. from five Indian Medical Centers. Indian Journal of Medical Research 135:359-364.

MARSIK, F.J.; NAMBIAR, S. 2011. Review of carbapenemases and AmpC- β -lactamases. The Pediatric Infectious Disease Journal 30(12):1094-1095.

MARTÍNEZ-ROJAS, D. D. D. 2009. β -lactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología 29(2):78-83.

MATA, C.; MIRÓ, E.; ALVARADO, A.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; TOLEMAN, M.; WALSH, T. R.; CRUZ, F.; NAVARRO, F. 2012. Plasmid typing and genetic context of AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital 1999–2007. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67: 115–122.

MATA, C.; NAVARRO, F.; MIRÓ, E.; WALSH, T. R.; MIRELIS, B.; TOLEMAN, M. 2011. Prevalence of SXT/R391-like integrative and conjugative elements carrying blaCMY-2 in *Proteus mirabilis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 66: 2266–2270.

MATA, C.; MIRÓ, E.; RIVERA, A.; MIRELIS, B.; COLL, P.; NAVARRO, F. 2010. Prevalence of acquired AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. Clinical Microbiology and Infection 16:472-476.

MATTHEW, M.; HARRIS, A. N.; MARSHALL, M. J.; ROSS, G. W. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. Journal of General Microbiology 88:169-178.

MAZUREK, J.; PUSZ, P.; BOK, E.; STOSIK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. 2013. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Populations Isolated from Farm Animals with Different Exposure to Antimicrobial Agents. Polish Journal of Microbiology 62(2):173–179.

McGANN, P.; SNESRUDI, E.; MAYBANK, R.; COREY, B.; ONG, A. C.; CLIFFORD, R.; HINKLE, M.; WHITMAN, T.; LESH, E.; SCHAECHERS, K. E. 2016. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of 2 *mcr-1* in the USA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60(7):4420-1.

MEDHANIE, G.A.; PEARL, D. L.; McEWEN, S. A.; GUERIN, M. T.; JARDINE, C.M.; SCHROCK, J.; LeJEUNE, J. T. 2014. A longitudinal study of feed contamination by European starling excreta in Ohio dairy farms (2007–2008). Journal of Dairy Science 97 :5230–5238 .

MEHRAD, B.; CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G.; LYNCH, J. P. 2015. Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. Chest. 147(5):1413-1421.

MESSAI, Y.; BENHASSINE, T.; NAIM, M.; PAUL, G.; BAKOUR, R. 2006. Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. Revista Española de Quimioterapia 19(2):144-151.

MIRÓ, E.; AGÜERO, J.; LARROSA, M. N.; FERNÁNCEZ, A.; CONEJO, M. C.; BOU, G.; GONZÁLEZ-LOPEZ, J. J.; LARA, N.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OLIVER, A.; ARACIL, B.; OTEO, J.; PASCUAL, A.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; ZAMORANO, L.; NAVARRO, F. 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 32(2), p.253–259.

MO, S. S.; SLETTEMEAS, J. S.; BERG, E. S.; NORSTROM, M.; SUNDE, M. 2016. Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins in the Norwegian Broiler Production. PLoS One 11(4):e0154019.

MOHAMUDHA, P. R.; HARISH, B. N.; PARIJA, S. C. 2012. Molecular description of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among nosocomial isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in India. Indian Journal of Medical Research 135:114-9.

MOROSINI, M. I.; AYALA, J. A.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; BLÁZQUEZ, J. 2000. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(11):3137-43.

NASSER, U.; HALDORSEN, G.; SIMONSEN, S.; SUNDSFJORD, A. 2010. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. Clinical Microbiology and Infection 16: 171–178.

NASIM, K.; ELSAYED, S.; PITOUT, J. D. D.; CONLY, J.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B. 2004. New Method for Laboratory Detection of AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology 42(10):4799-4802.

NEDJAI, S.; BARGUIGUA, A.; DJAHMI, N.; JAMALI, L.; ZEROUALI, K.; DEKHIL, M.; TIMINOUNI, M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Médecine et Maladies Infectieuses 42(1):20-9.

NELSON, E. C. e ELISHA, B. G. 1999. Molecular Basis of AmpC Hyperproduction in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(4):957-959.

NELSON, D. L. e COX, M. 2002. Capítulo 5: Lehninger – Princípios de Bioquímica. 3ed. São Paulo: Sarvier.

NGUYEN, D. P.; NGUYEN, T. A. D.; LE, T. H.; TRAN, N. M. D.; NGO, T. P.; DANG, V. C.; KAWAI, T. ; KANKI, M.; KAWAHARA, R.; JINNAI, M.; YONOGLI, S.; HIRAI, Y.; YAMAMOTO, Y.; KUMEDA, Y. 2016. Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. BioMed Research International 2016 :9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8182096>.

NÓBREGA, D. B.; GUIDUCE, M. V. S.; GUIMARÃES, F. F.; RIBOLI, D. F.; CUNHA, M. L. R. S.; LANGONI, H.; PANTOJA, J. C. F.; LUCHEIS, S. B. 2013. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from three dairy herds. Pesquisa Veterinária Brasileira 33(7).

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. Future Microbiology 2(3):297-307.

NUKAGA, M.; HARUTA, S.; TANIMOTO, K.; KOGURE, K.; TANIGUCHI, K.; TAMAKI, M.; SAWAI, T. 1995. Molecular Evolution of a Class C β -Lactamase Extending Its Substrate Specificity. The Journal of Biological Chemistry 270(11):5729-5735.

NHUNGA, P. H. 2007. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 58:153–161.

OLSSON, O.; BERGSTROM, S.; LINDBERG, F. P.; NORMARK, S. 1983. ampC β -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: Natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. Proceedings of the National Academy of Science USA 80:7556-7560.

PAPAGIANNITSIS, C.C.; KOTSAKIS, S.D.; GNIADKOWSKI, T.M.; MIRIAGOU, V.; HRABAK, J. 2014. Identification of CMY-2-Type Cephalosporinases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58(5):2952-2957.

PAPANICOLAOU, G. A.; MEDEIROS, A. A.; JACOBY, G. A. 1990. Novel Plasmid-Mediated 1-Lactamase (MIR-1) Conferring Resistance to Oxyimino- and ot-Methoxy 1-Lactams in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34(11):2200-2209.

PARMAR, A.; IYER, A.; VINCENT, C. S.; LYSEBETTEN, D. V.; PRIOR, S. H.; MADDER, A.; TAYLOR, E. J.; SINGH, I. 2016. Efficient total syntheses and biological activities of two teixobactin analogues. Chemistry Communications 52:6060-6063.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; GRINBAUM, R. S.; ELMOR DE ARAÚJO, M. R.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. 2008. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. Journal of Medical Microbiology 57(Pt 12):1590-2.

PÉREZ-PÉREZ, F.J. and HANSON, N.F. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC- β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 40(6):2153-2162.

PETER-GETZLAFF, S.; POLSFUSS, S.; POLEDICA, M.; HOMBACH, M.; GIGER, J.; BÖTTGER, E. C.; ZBINDEN, R.; BLOEMBERG, G. V. 2011. Detection of AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. Journal of Clinical Microbiology 49(8):2924-2932.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(1):1-11.

PIRES, J.; TARACILA, M.; BETHEL, C. R.; DOI, Y.; KASRAIAN, S.; TINGUELY, R.; SENDI, P.; BONOMO, R. A.; ENDIMIANI, A. 2015. *In vivo* Evolution of CMY-2 to CMY-33 β -Lactamase in *Escherichia coli* ST131: Characterization of an Acquired Extended-

Spectrum AmpC (ESAC) Conferring Resistance to Cefepime. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59(12):7483-7488.

POLSFUSS, S.; BLOEMBERG, G. V.; GIGER, J.; MEYER, V.; BÖTTGER, E. C.; HOMBACH, M. 2011. Practical approach for reliable detection of AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology 49(8):2798-2803.

POWER, P.; GALLEN, M.; AYALA, J. A.; GUTKIND, G. 2006. Biochemical and Molecular Characterization of Three New Variants of AmpC β -Lactamases from *Morganella morganii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(3):962–967.

PRADHAN, N. P.; BHAT, S. M.; GHADAGE, D. P. 2014. Nosocomial infections in the medical ICU: a retrospective study highlighting their prevalence, microbiological profile and impact on ICU stay and mortality. Journal of Association Physicians of India 62 (10):18-21.

PRATT, C. W e CORNELLY, K. 2006. Capítulo 4: Bioquímica Essencial. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RANDALL, L.; HEINRICH, K.; HORTON, R.; BRUNTON, L.; SHARMAN, M.; BAILEY-HORNE, V.; SHARMA, M.; McLAREN, I.; COLDHAM, N.; TEALE, C.; JONES, J. 2014. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. Research in Veterinary Science 96(1):15–24.

RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nature Reviews Drug Discovery 9:117-128.

RAPOPORT, M.; MONZANI, V.; PASTERAN, F.; MORVAY, L.; FACCONI, D.; PETRONI, A.; GALAS, M. 2008. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC β -lactamase finally emerging in Argentina. International Journal of Antimicrobial Agents 31(4):385-387.

RAYAMAJHI, N.; KANF, S. G.; LEE, D. Y.; KANG, M .L.; LEE, S. I.; PARK, K. Y.; LEE, H. S.; YOO, H. S. 2008. Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β -lactamases from cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. International Journal of Food Microbiology 124:183-187.

RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nature Reviews Drug Discovery 9:117-128.

REICH, F.; ATANASSOVA, V.; KLEIN, G. 2013. Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. Emerging Infectious Diseases Journal 19(8): 1253–1259.

REISBIG, M. D. e HANSON, N. D. 2004. Promoter Sequences Necessary for High-Level Expression of the Plasmid-Associated AmpC β -Lactamase Gene *bla*MIR-1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48(11): 4177-4182.

RHIMI-MAHJoubi, F.; BERNIER, M.; ARLET, G.; JEMAA, Z. B.; JOUVE, P.; HAMMAMI, A.; PHILIPPON, A. 2002. Mise en évidence de la céphalosporinase plasmidique ACC-1 dans différentes entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolées dans un hôpital tunisien (Sfax 19987-2000). Pathologie Biologie 50:7-11.

RODRÍGUEZ, I.; BAROWNICK, W.; HELMUTH, R.; MENDOZA, C.; RODICIO, M. R.; SCHROETER, A.; GUERRA, B. 2009. Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 64:301–309.

ROCHE, C.; BOO, T. W.; WALSH, F.; CROWLEY, B. 2008. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. Clinical Microbiology and Infection 14(6):616-8.

RODRÍGUEZ, I.; BAROWNICK, W.; HELMUTH, R.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R.; SCHROETER, A.; GUERRA, B. 2009. Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -

lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 64:301-309.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; FERNÁNDEZ-ECHAURI, P.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; ALBA, P. D.; BRIALES, A.; PASCUAL, A. 2012. Genetic characterization of an extended-spectrum AmpC cephalosporinase with hydrolysing activity against fourth-generation cephalosporins in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* selected in vivo. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67(1):64-68.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. 2009. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53(5):1766-1771.

RUPPÉ, E.; BIDET, P.; VERDET, C.; ARLET, G.; BINGEN, E. 2006. First Detection of the Ambler Class C 1 AmpC β -Lactamase in *Citrobacter freundii* by a New, Simple Double-Disk Synergy Test. Journal of Clinical Microbiology 44(11):4204-4207.

RUSSOTTO, V.; CORTEGIANI, A.; GRAZIANO, G.; SAPORITO, L.; RAINERI, S. M.; MAMMINA, C.; GIARRATANO, A. 2015. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. Infection and Drug Resistance 8:287-296.

SAID, L. B.; JOUINI, A.; ALONSO, C. A.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K. B.; TORRES, C. 2016. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. Science of the Total Environment 550:1103-1109.

SANTIAGO, G. S. 2013. Caracterização da resistência antimicrobiana e estudo fenogenotípico da produção de β -lactamases em enterobactérias associadas à etiologia da mastite bovina. Dissertação (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SANTIAGO, G. S.; LASAGNO, M. C.; ALENCAR, T. A.; RIBEIRO, L.; DUBENCZUK, F. C.; OLIVA, M. S.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O. 2015. AmpC β -lactamase production in enterobacteria associated with bovine mastitis in Brazil. African Journal of Microbiology Research 9(8):503-508.

SANTOS, J. M.; FREIRE, P.; VICENTE, M.; ARRAIANO, C. M. 1999. The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. Molecular Microbiology, 32(4):789-798.

SANTOS, J. M.; LOBO, M.; MATOS, A. P.A.; PEDRO, M.A.; ARRAIANO, C. M. 2002. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 45 (6):1729-1740.

SANZ, S.; OLARTE, C.; MARTÍNEZ-OLARTE, R.; NAVAJAS-BENITO, E. V.; ALONSO, C. A.; HIDALGO-SANZ, S.; SOMALO, S.; TORRES, C. 2015. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. International Journal of Food Microbiology 197:40-44.

SCHMIDTKE, A. J.; HANSON, N. D. 2006. Model System to Evaluate the Effect of *ampD* Mutations on AmpC-Mediated β -Lactam Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(6):2030-2037.

SCHNEIDER, I.; MARKOVSKA, R.; MARTEVA-PROEVSKA, Y.; MITOV, I.; MARKOVA, B.; BAUERNFEIND, A. 2014. Detection of CMY-99, a Novel Acquired AmpC-Type β -Lactamase, and VIM-1 in *Proteus mirabilis* Isolates in Bulgaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58(1): 620-621.

SCHUSTER, M.; SEXTON, D. J.; DIGGLE, S.P.; GREENBERG, E.P. 2013. Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. Annual Review of Microbiology 67:43-63.

- SELLERA, F. P.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S.; GARGANO, R. G.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; POGLIANI, F. C. 2015. In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy S1572-1000(15):30023-5.
- SHAHID, M.; MALIK, A.; AGRAWAL, M.; SINGHAL, S. 2004. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC β -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54:684–687.
- SHI, W.; LI, K.; JI, Y.; JIANG, Q.; WANG, Y.; SHI, M.; MI, Z. 2013. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. Brazilian Journal of Microbiology 44(2):435-442.
- SILVA, M. R. 2009. Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito. Dissertação (Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- SILVA, C. D. R.; SILVA Jr, M. 2015. Strategies for appropriate antibiotic use in intensive care unit review. Einstein (São Paulo), ahead of print Epub.
- SIMNER, P. J.; ZHANEL, G. G.; PITOUT, J.; TAILOR, F.; McCracken, M.; MULVEY, M. R.; LAGACÉ-WIENS, P. R. S.; ADAM, H. J.; HOBAN, D. J.; THE CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE (CARA). 2011. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase– and AmpC β -lactamase–producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007–2009 study. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 69: 326–334.
- SIU, L.K; LU, P.L.; CHEN, J.Y; LIN, F. M.; CHANG, S. C. 2003. High-Level Expression of AmpC β -Lactamase Due to Insertion of Nucleotides between β -10 and β -35 Promoter Sequences in *Escherichia coli* Clinical Isolates: Cases Not Responsive to Extended-Spectrum-Cephalosporin Treatment. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47(7):2138-2144.
- STAPLETON, P. J.; MURPHY, M.; McCALLION, N.; BRENNAN, M.; CUNNEY, R.; DREW, R. J. 2015. Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in neonatal intensive care units: a systematic review. Archives of Disease in Child Fetal Neonatal Edition pii: fetalneonatal-2015-308707. doi: 10.1136/archdischild-2015-308707.
- SOBIA, F.; SHAHID, M.; SINGH, A.; KHAN, H. M.; SHUKLA, I.; MALIK, A. 2011. Occurrence of bla_{ampC} in cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from a North Indian tertiary care hospital. New Zealand Journal of Medical Laboratory Science 65(65):5-9.
- SOHN, S. G.; LEE, J.J.; SOHN, E. S.; KANG, L-W; LEE, S. H. 2008. Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC β -lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61:965-970.
- SONG, W.; LEE, H.; LEE, K.; JEONG, S. H.; BAE, I. K.; KIM, J.-S.; KWAK, H.- S. 2009. CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. Journal of Medical Microbiology 58:261–266.
- STEWART, C.D.; RASHEED, J.K.; HUBERT, S. K.; BIDDLE, S. K.; RANEY, P. M.; ANDERSON, G. J.; WILLIAMS, P. P.; BRITTAIN, K. L.; OLIVER, A.; McGOWAN, J. E. Jr; TENOVER, F.C. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -lactamase detection methods. Journal of Clinical Microbiology 39(8):2864-2872.

SU, W. Y.; GOTTLIEB, T.; MERLINO, J. 2012. Optimal phenotypic testing of AmpC β -lactamases using boronic acid solutions. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 31:49–51.

SUZUKI, S.; OHNISHI, M.; KAWANISHI, M.; AKIBA, M.; KURODA, M. 2016. Investigation of a plasmid genome database for colistinresistance gene *mcr-1*. Lancet Infect Dis. 16(3):284-5.

THOMSON, K. S. 2001. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases. Emerging Infectious Diseases 7(2):333-336.

TONDI, D.; CALÓ, S.; SHOICHET, B. K.; COSTI, M. P. 2010. Structural study of phenyl boronic acid derivatives as AmpC β -lactamase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20: 3416–3419.

TORO-PEINADO, I.; MEDIAVILLA-GRADOLPHA, M. C.; TORMO-PALOP, N.; PALOP-BORRASA, B. 2015. Diagnostico microbiologico de las infecciones urinarias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 33 (Supl2): 32-39.

TOTH, J. D. ; ACETO, H. W. ; RANKIN, S. C. ; DOU, Z. 2013. Short communication : Survey of animal-borne pathogens in the farm environment of 13 dairy operations. Journal of Dairy Science 96 : 5756-5761.

TREVIÑO, M.; NAVARRO, D.; BARBEITO, G.; ARESES, P.; GARCÍA-RIESTRA, C.; REGUEIRO, B. J. 2012. *Proteus mirabilis* productor de AmpC plasmídica en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela: prevalencia y caracterización molecular por rep-PCR y MALDI-TOF MS. Revista Española de Quimioterapia 25(2):122-128.

VASQUES, M. R. G.; BELLO, A. R.; LAMAS, C. C.; PEREIRA, J. A. A. 2011. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intensive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 15(1): 28-33.

VERDET, C.; ARLET, G.; REDJEB, S. B.; HASSEN, A. B.; LAGRANGE, P. H.; PHILIPPON, A. 1998. Characterisation of CMY-4, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. FEMS Microbiology Letters 169:235-240.

VINGOPOULOU, E. L.; SIARKOU, V. L.; BATZIAS, G.; KALTSOGIANNIS, F.; SIANOU, E.; TZAVARAS, I.; KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; SOFIANOU, V. L.; TZELEPI, E.; MIRIAGOU, V. 2014. Emergence and maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* of canine origin harbouring a blaCMY-2-IncI1/ST65 plasmid and topoisomerase mutations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 69:2076-2080.

VOETS, G.M.; PLATTEEL, T. N.; FLUIT, A. C.; SCHARRINGA, J.; SCHAPENDONK, C. M. et al. 2012. Population Distribution of β -Lactamase Conferring Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Human Clinical Enterobacteriaceae in The Netherlands. PLoS ONE 7(12):e52102.

VOETS, G. M.; FLUIT, A. C.; SCHARRINGA, J.; SCHAPENDONK, C.; van denMUNCKHOF, T.; LEVERSTEIN-van HALL, M. A.; STUART, J. C. 2013. Identical plasmid AmpC β -lactamase genes and plasmid types in E. coli isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. International Journal of Food Microbiology 167: 359–362.

WALTEMEYER, J. R. ; HENNINGS, R. ; HOOSTAL, M. J. 2014. Seasonal shifts in bacteria associated with Jersey cows on a small dairy farm and the potential for bedding choice and low levels of iodine use to inhibit mastitic pathogens. Preventive Veterinary Medicine 113(4):614-9.

WOHLWEND, N.; ENDIMIANI, A.; FRANCEY, T.; PERRETEN, V. 2015. Third-generation-cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from humans and companion animals in Switzerland: spread of a DHA-producing sequence type 11 clone in a veterinary setting. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59(5):2949-55.

WATERS, B. and MUSCEDERE, J. A. 2015. Update on Ventilator-Associated Pneumonia: New Insights on Its Prevention, Diagnosis, and Treatment. Current Infectious Disease Report 17(8):496.

WOHLWEND, N.; ENDIMIANI, A.; FRANCEY, T.; PERRETEN, V. 2015. Third generation-cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from humans and companion animals in Switzerland: spread of a DHA-producing ST11 clone in the veterinary setting. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Online) doi:10.1128/AAC.04408-14.

WU, G.; MICHAELA, J. D.; MAFURA, M. T. et al. 2013. Comparative Analysis of ESBL-Positive *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany. PLoS ONE 8(9): e75392. doi:10.1371/journal.pone.0075392.

YAGI, T.; WACHINO, J.; KUROKAWA, H.; SUZUKI, S.; YAMANE, K.; DOI, Y.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 43:2551-2558.

YANG, W.; GAO, X.; WANG, B. 2003. Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. Medicinal Research Reviews 23(3): 346-368.

YONG, D.; PARK, R.; YUM, J. H.; LEE, K.; CHOI, E. C.; CHONG, Y. 2002. Further modification of the Hodge test to screen AmpC β -lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Microbiological Methods 51:407-410.

YOON, Y. K.; CHEONG, H. W.; PAI, H.; ROH, K. H.; KIM, J. Y.; PARK, D. W.; SOHN, J. W.; LEE, S. E.; CHUN, B. C.; SIM, H. S.; KIM, M. J. 2011. Molecular analysis of a prolonged spread of *Klebsiella pneumoniae* co-producing DHA-1 and SHV-12 β -lactamases. The Journal of Microbiology 49(3): 363-368.

YUSUF, I.; QABLI, S. M.; BALARABE, AL.; KABIR, A.; KABIR, M. R.; OLIVIA, E. S.; ABBAS, R. 2015. Detection of colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* co-producing extended spectrum, AmpC β -lactamase and carbapenemase in a tertiary hospital in Nigeria. Antimicrobial Resistance and Infection Control 4(Suppl 1):P129.

ZHANG, X.; LOU, D.; XU, Y.; SHANG, Y.; LI, D.; HUANG, X.; LI, Y.; HU, L.; WANG, L.; YU, F. 2013. First identification of coexistence of blaNDM-1 and blaCMY-42 among *Escherichia coli* ST167 clinical isolates. BMC Microbiology 13:282.

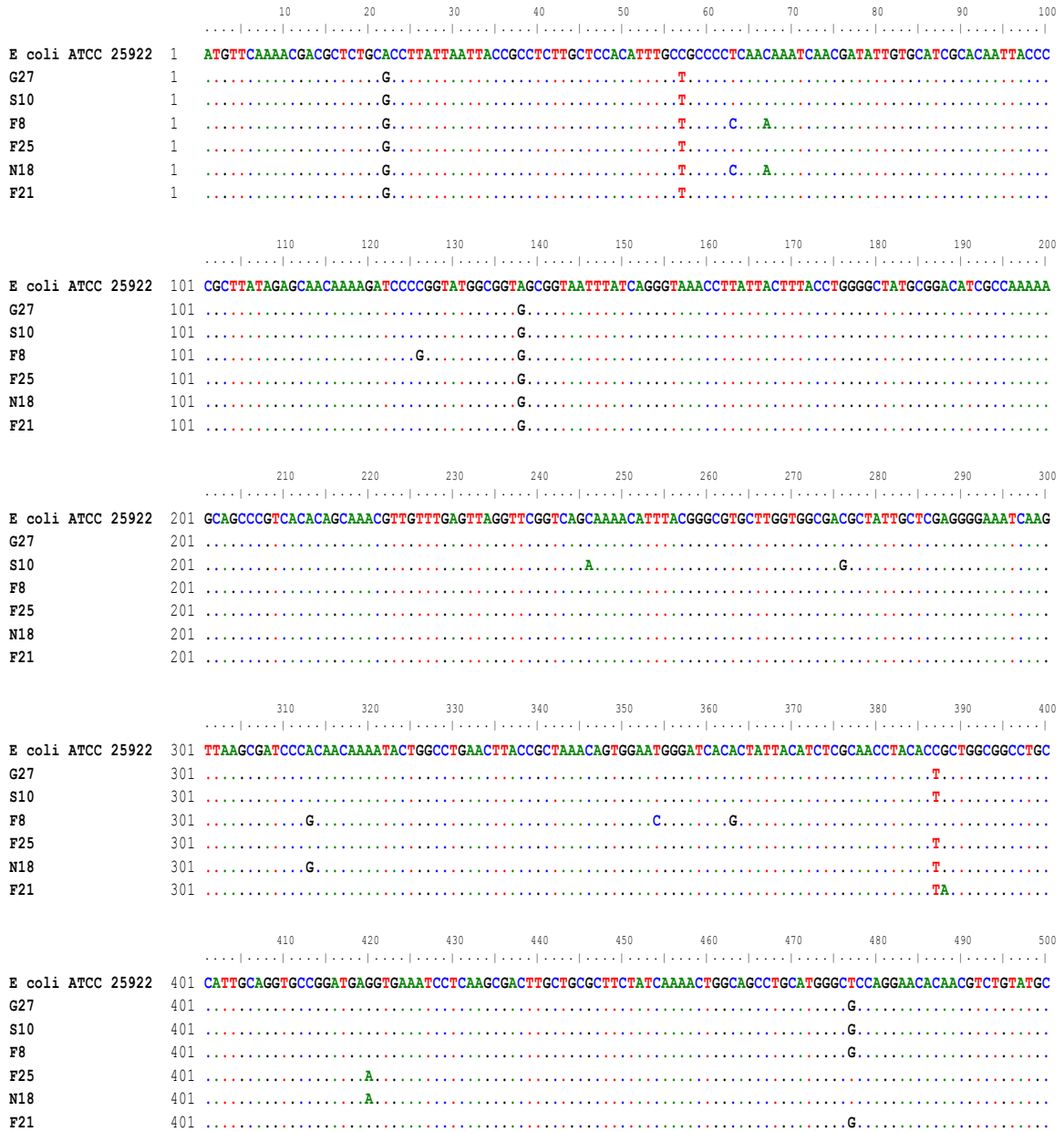
ZENG, X.; LIN, J. 2013. β -lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Frontiers in Microbiology 4.

ANEXOS

Anexo 1 - Preparo dos discos de cefoxitina com ácido borônico

O preparo da solução de ácido borônico de concentração 40mg/mL foi segundo a metodologia da Nota Técnica nº01/2013, da Anvisa. O ácido borônico (ácido 3-aminofenilborônico – Sigma-Aldrich) foi diluído em dimetilssulfóxido (DMSO) e água estéril, ambas em igual volume. Essa solução não passou por esterilização por filtração, que é opcional, e o armazenamento da solução foi realizada em freezer -20°C. No momento do ensaio, adicionou-se 10µL da solução de ácido borônico 40mg/mL a cada disco de cefoxitina (30µg - Oxoid) e deixou secar por 20 minutos. Não é aconselhável guardar o disco após a adição do ácido pois pode ocorrer a perda de eficácia do antimicrobiano.

Anexo 2 – Alinhamento do gene ampC de Escherichia coli provenientes de rebanho leiteiro brasileiro utilizando o programa Mega v7.



```

          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E coli ATCC 25922 501 CAACTCCAGTATCGGTTTGTTCGGCGCAC TGGCTGTGAAGCCGCTGGTTTGAGTTTGGAGCAGGCGATGAAAAC TCGTGTCTCCAGCCACTCAAATC
G27              501 .....C...A.....
S10              501 .....C...A.....
F8               501 .....C.....
F25              501 .....C.....
N18              501 .....C.....
F21              501 .....C...A.....

```

```

          610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E coli ATCC 25922 601 AATCATACGTGGATTAATGTACCGTCCGCAGAAGAAAAGAACTACGCCCTGGGATATCGCGAAGGTAAGGCAGTACATGTTTCGCCAGGGGCGTTAGATG
G27              601 ..C.....C.....T.....C.....T.....
S10              601 ..C.....C.....T.....C.....T.....
F8               601 ..C.....C.....T.....G.....
F25              601 ..C...A.....C.....T.....G.....
N18              601 ..C...A.....C.....T.....G.....
F21              601 ..C.....C.....T.....C.....T.....

```

```

          710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E coli ATCC 25922 701 CTGAAGCTTATGGTGTGAAGTCGACCATTGAAGATATGGCCCGCTGGGTGCAAAGCAATTTAAAACCCCTTGATATCAATGAGAAAACACTTCAACAAGG
G27              701 ...A.....T.....A.G.....A.G..T...G.....C..C.....G....
S10              701 ...A.....T.....A.G.....A.G..T...G.....C..C.....G....
F8               701 .....T.....T.....
F25              701 .....T.....G.....
N18              701 .....T.....G.....
F21              701 ...A.....T.....A.G.....A.G..T.A..G.....C..C.....

```

```

          810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E coli ATCC 25922 801 GATACAAC TGGCACAATCTCGCTACTGGCAAAACCGCGCATATGTATCAGGGTCTGGGCTGGGAATGCTGGACTGGCCGGTAAATCCTGACATCATCATT
G27              801 .....C.....G.....
S10              801 .....C.....G.....
F8               801 .....G.....
F25              801 .....G.....
N18              801 .....G.....
F21              801 .....G.....

```

```

          910      920      930      940      950      960      970      980
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E coli ATCC 25922 901 AACGGCAGTGACAATAAAATTGCAC TGGCAGCACGCCCGTAAAAACCGATTACGCCCCCAACTCCTGCAGTACGCGCATCATGGGTACA
G27              901 .....G.....A.....G.....AC
S10              901 .....G.....A..T.....G.....AC
F8               901 .....G.....AC
F25              901 .....G.....AC
N18              901 .....G.....AC
F21              901 .....G.....GAC

```

Anexo 3 – Quadro de códigos de aminoácidos, segundo a IUPAC.

Código de uma letra	Código de três letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina