

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**  
**Área Análises Clínicas**

**“Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do tipo  
AmpC plasmidial em *Escherichia coli*”**

Darlan Augusto da Costa Rocha

Dissertação para obtenção do título  
de Mestre em Ciências

Orientador:  
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

**São Paulo**  
**2014**

Darlan Augusto da Costa Rocha

**“Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do tipo  
AmpC plasmidial em *Escherichia coli*”**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

**São Paulo**

**2014**

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rocha, Darlan Augusto da Costa  
R672c Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do  
tipo AmpC plasmidial em *Escherichia coli* / Darlan Augusto da  
Costa Rocha. -- São Paulo, 2014.  
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia  
médica 2. *Escherichia coli* 3. Plasmídeos I. T. II. Sampaio, Jorge  
Luiz Mello, orientador.

616.01 CDD

Darlan Augusto da Costa Rocha

**“Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do tipo  
AmpC plasmidial em *Escherichia coli*”**

Comissão Julgadora da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

---

Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer minha mãe Regina Márcia da Costa por me estimular a descobrir o prazer do estudo.

Meu pai Waldir Rocha, meu irmão Danilo Henrique da Costa Rocha e minha namorada Flávia Rubiano Saconato por todo apoio, paciência e ajuda durante o período da pós-graduação e pelo estímulo anterior.

Meus grandes amigos Juliana Coutinho Campos, Artemir Coelho de Brito, Mayne de Oliveira Pereira, Elaine Menezes Barros, Alexandre Inácio Cruz de Paula e Leila Priscilla Pinheiro da Silva pelos ensinamentos, apoio, dicas, ajuda na execução de experimentos e o excelente ambiente de trabalho que todos ajudaram a construir.

Meus amigos Daniela Vargas Horvath, Marina Eloi, Ricardo José Soares, João Carlos Ortega, Gabrielle Zammataro, Cisele Carvalho pelo desespero compartilhado e a imensa ajuda disponibilizada em meu local de trabalho Centro de Radiologia e Ultrassonografia CURA.

A Profa. Elsa Mamizuka pelo apoio durante o trabalho e pela cepa produtora de CMY-2-like gentilmente cedida como controle positivo nos testes fenotípicos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Sampaio pelo seu tempo, paciência, apoio, conselhos de orientador, pai e amigo, pelas risadas e todos os ensinamentos diários durante o período da pós-graduação.

“Quero melhorar ainda mais, sinto necessidade de fazer melhor, sempre melhor. Quando acho que cheguei ao ponto máximo, descubro que é possível superá-lo.”

Ayrton Senna

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	Infecções causadas por <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.2	Parede celular bacteriana .....	11
1.3	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	13
1.4	Resistência a $\beta$ -lactâmicos.....	14
1.4.1	Classificação das $\beta$ -lactamases.....	15
1.5	$\beta$ -lactamases AmpC .....	16
1.5.1	Deteção de $\beta$ -lactamases AmpC .....	20
2	MOTIVAÇÃO .....	24
3	OBJETIVO .....	25
3.1	Objetivos específicos .....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1	Origem dos isolados .....	26
4.2	Deteção fenotípica de AmpCs plasmidiais.....	26
4.3	Deteção de genes que codificam AmpCs.....	27
4.4	Enterobacterial repetitive intergenic consensus - ERIC-PCR .....	30
4.5	Deteção fenotípica de carbapenemases.....	31
4.6	Teste de hidrólise de cefoxitina .....	31
4.7	Determinação da concentração inibitória mínima nos isolados falsamente positivos no teste com ácido fenilborônico.....	32
4.8	Teste confirmatório para ESBL.....	32
4.9	Extração de plasmídeos .....	33
4.10	Amplificação e sequenciamento de genes que codificam AmpCs plasmidiais..	34
4.11	Cálculos dos parâmetros de desempenho dos testes .....	35
5	RESULTADOS .....	37
5.1	Bloqueio enzimático com ácido fenilborônico.....	37
5.2	Otimização das reações multiplex para deteção de genes <i>bla</i> <sub>ampC</sub> .....	38
5.3	Correlação entre testes fenotípicos e presença de genes que codificam AmpC plasmidial .....	41
5.4	Sequenciamento dos genes que codificam AmpCs plasmidiais .....	41
5.5	Avaliação da sensibilidade aos carbapenêmicos nos isolados produtores de CMY-2 .....	43
5.6	Avaliação da atividade de hidrólise de cefoxitina nos isolados positivos para o bloqueio com AFB e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs plasmidiais .....	45

5.7	Detecção fenotípica de ESBLs nos isolados positivos para o bloqueio com ácido fenilborônico e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs .....	46
5.7.1	Determinação da concentração inibitória mínima para ceftazidima.....	46
5.7.2	Detecção de ESBL com bloqueio com clavulanato .....	47
5.8	Avaliação da relação clonal entre os isolados que albergam genes <i>bla</i> <sub>CMY</sub> .....	47
5.9	Perfil plasmidial dos isolados que albergam genes <i>bla</i> <sub>CMY</sub> .....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
6.1	Detecção fenotípica e genotípica de <i>bla</i> <sub>ampC</sub> .....	52
6.2	Correlação entre testes fenotípicos e presença de genes que codificam AmpC plasmidial .....	55
6.3	Sequenciamento dos genes que codificam AmpCs plasmidiais.....	57
6.4	Avaliação da sensibilidade aos carbapenêmicos nos isolados produtores de CMY .....	58
6.5	Avaliação da atividade de hidrólise de cefoxitina nos isolados positivos para o bloqueio com ácido fenilborônico e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs.....	58
6.6	Determinação da concentração inibitória mínima para ceftazidima e teste confirmatório para ESBL.....	59
6.7	Avaliação da relação clonal e perfil plasmidial entre os isolados que albergam genes <i>bla</i> <sub>CMY</sub> .....	60
7	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS .....	63
	APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios.....	73
	APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem.....	78
	APÊNDICE C - Resultados de ensaios realizados com os isolados - ensaios de bloqueio enzimático com Imipenem e Ertapenem.....	84
	APÊNDICE D – Cálculos dos parâmetros de desempenho do teste de detecção de AmpCs plasmidiais com Cefoxitina, ceftazidima e bloqueio enzimático com o ácido fenilborônico.....	89



## RESUMO

ROCHA, D. A. C. "Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do tipo AmpC plasmidial em *Escherichia coli*" 2014. 92f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

**Introdução:** As enzimas do grupo AmpC degradam cefalosporinas e cefamicinas e não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam. Podem ser codificadas por genes de localização plasmidial ou cromossômica. A sua detecção tem importância epidemiológica, pois a expressão concomitante à perda de porinas em Enterobactérias pode levar à resistência aos carbapenêmicos, fármacos amplamente utilizados no tratamento de infecções graves. Os relatos de detecção de AmpC plasmidial no Brasil são escassos, mas a análise do perfil de sensibilidade de *Escherichia coli* isoladas de casos de infecções urinárias de pacientes atendidos em um laboratório privado da cidade de São Paulo, no período de 2006 à 2010, evidenciou um aumento considerável de resistência à cefoxitina, um marcador para expressão de AmpC plasmidial. Em 2006 a frequência era de 0,03% e em 2011 foi de 0,65%. Uma das hipóteses para esse aumento é a disseminação de clones ou de genes que codificam AmpC, transferidos em plasmídeos. **Objetivo:** Caracterizar os determinantes genéticos em *E. coli* com fenótipo compatível com produção de AmpC plasmidial. **Material e métodos:** Foram estudadas todas as *E. coli* isoladas de cultura de urina, não sensíveis à cefoxitina, detectadas no Fleury Medicina e Saúde em São Paulo, no período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro de 2012. Os isolados foram avaliados fenotipicamente quanto à pureza, identificação da espécie e bloqueio enzimático com discos de cefoxitina e ceftazidima adicionados de ácido fenilborônico. A presença de genes que codificam AmpCs plasmidiais foi avaliada utilizando-se dois métodos distintos de PCR. Foi realizado o sequenciamento dos genes detectados. O desempenho do bloqueio enzimático com ácido fenilborônico foi determinado utilizando-se a PCR como padrão ouro. O perfil plasmidial e a clonalidade foram avaliados respectivamente por lise alcalina e ERIC-PCR. **Resultados e conclusões:** De um total de 2.494 *E. coli* 12 albergavam genes de AmpC plasmidial; a frequência de AmpC plasmidial foi portanto de 1,8% em pacientes hospitalizados 0,46% em pacientes ambulatoriais. O sequenciamento dos genes que codificam AmpCs plasmidiais evidenciou tratarem-se de 11 *bla*<sub>CMY-2</sub> e uma *bla*<sub>CMY-4</sub>. O melhor desempenho do teste fenotípico com cefoxitina, ceftazidima e ácido fenilborônico foi obtido quando utilizados um mínimo de 5 mm de diferença entre o halo de inibição com o disco adicionado de ácido fenilborônico e puro para cefoxitina e ceftazidima. Com esses parâmetros a sensibilidade foi de 100%, a especificidade de 100%, o valor preditivo positivo 100 % e valor preditivo negativo 100%. Foi observada a presença e disseminação de três grupos clonais de *E. coli* produtoras de CMY entre hospitais na cidade de São Paulo.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, AmpC, plasmídios, resistência antimicrobiana, cefalosporinas

## ABSTRACT

ROCHA, D. A. C. "Phenotypic and genotypic characterization of plasmidial AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*". 2014. 92f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

**Introduction:** AmpC enzymes can degrade cephalosporins and cephamycins and are not inhibited by clavulanic acid, sulbactam or tazobactam. They can be encoded by genes of plasmid or chromosomal location. Detecting these enzymes is epidemiologically important because their expression and concomitant porins loss in *Enterobacteriaceae* can lead to resistance to carbapenems, antimicrobials widely used to treat serious infections. Reports of detection of plasmidial AmpCs in Brazil are scarce, but the analysis of the susceptibility profile of *Escherichia coli* isolated from cases of urinary tract infection in patients attended in a private laboratory, located at the city of São Paulo, from 2006 to 2010 indicated a considerable increase in cefoxitin resistance, a marker for plasmidial AmpC expression. In 2006 the rate was 0.03% and in 2011 it was 0.65%. One hypothesis for this increase was the spread of clones or genes encoding AmpC transferred into plasmids. **Objective:** To characterize the genetic determinants in *E. coli* presenting a phenotype consistent with plasmidial AmpC production. **Material and Methods:** We studied all *E. coli* not susceptible to cefoxitin isolated in urine cultures at Fleury Medicine and Health, in São Paulo, during the period from January 2<sup>nd</sup> to February 1<sup>st</sup> 2012. The isolates were phenotypically evaluated for purity, species identification and enzymatic blockage with cefoxitin and ceftazidime disks with added phenylboronic acid. The presence of genes encoding plasmidial AmpCs was evaluated using two different PCR methods. Sequencing of the genes detected was obtained. The performance of the enzymatic blockage with phenylboronic acid was determined using PCR as a gold standard. The plasmid profile and clonality were evaluated respectively by alkaline lysis and ERIC-PCR. **Results and conclusions:** Among 2,494 *E. coli* isolates, 12 had genes encoding for plasmidial AmpC; consequently the frequency of plasmidial AmpC in *E. coli* was 1.8% in inpatients and 0.46% in outpatients. Sequencing of the genes encoding plasmidial AmpCs showed them to be *bla*<sub>CMY-2</sub> and just one *bla*<sub>CMY-4</sub>. The better performance of the phenotypic test was obtained when at least 5 mm inhibition zone difference was observed between the disc of cefoxitin and ceftazidime with added phenylboronic acid. With these parameters the sensitivity was 100%, specificity 100%, positive predictive value 100% and negative predictive value 100%. The presence and the dissemination of three clonal groups of CMY producing *E. coli* was observed among hospitals located at the city of São Paulo.

**Key-words:** *Escherichia coli*, AmpC, plasmids, antimicrobial resistance, cefalosporins.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Infecções causadas por *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É a espécie mais frequentemente isolada de amostras de origem humana em laboratórios de microbiologia clínica. *E. coli* tem sido reportada em doenças infecciosas que acometem quase todos os tecidos e sistemas orgânicos de humanos, e é um dos agentes mais frequentes de sepse (KAPER et al., 2004).

*E. coli* constitui uma fração significativa da microbiota intestinal de pessoas saudáveis; no entanto, algumas cepas podem causar infecções intestinais ou extra-intestinais, que podem ser localizadas ou sistêmicas. As infecções urinárias e bacteremias secundárias a infecções intra-abdominais são as infecções extra-intestinais mais frequentemente causadas por esse patógeno (KAPER et al., 2004).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são um dos grupos mais utilizados no tratamento das infecções extraintestinais por *E. coli*. Uma das limitações no tratamento com  $\beta$ -lactâmicos é a expressão de  $\beta$ -lactamases, enzimas bacterianas capazes de degradar esse grupo de antimicrobianos (PELEG; HOOPER, 2010). Não há dados recentes publicados do Brasil, mas dados da América Latina, nos quais estão incluídos informações de três centros distintos no Brasil, referentes aos anos de 2008 a 2010, indicando uma taxa de resistência de 6,3% à cefoxitina em *E. coli* (GALES et al., 2012). Em *E. coli* o mecanismo de resistência à cefoxitina usualmente é a produção de AmpC plasmidiais (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000); portanto caracterizar os determinantes genéticos dessa resistência é essencial para entendimento dos mecanismos que permitem a sua disseminação.

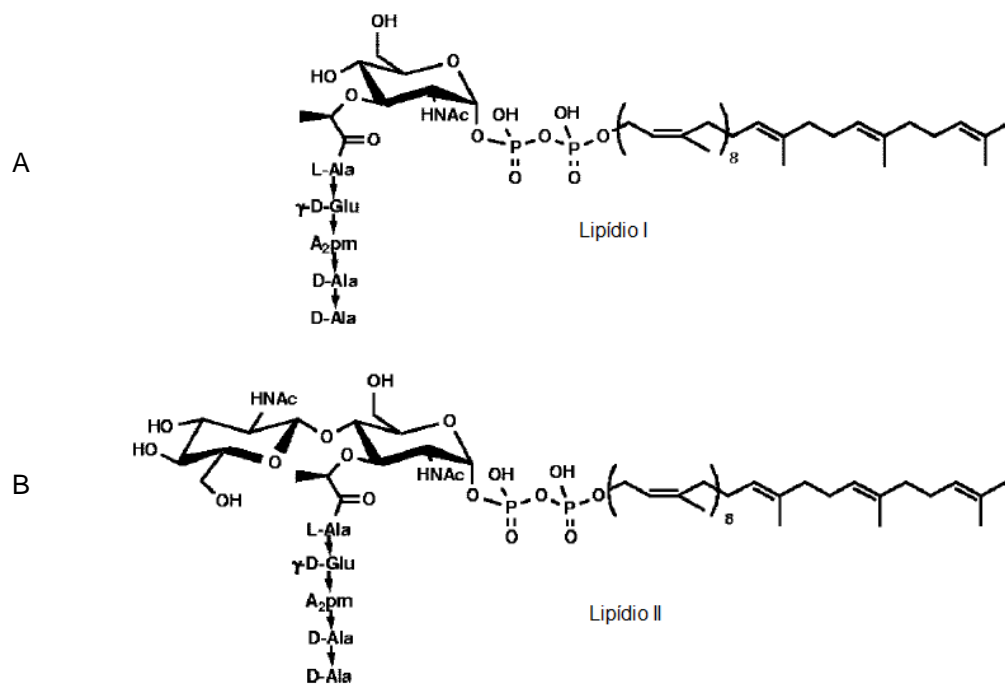
### 1.2 Parede celular bacteriana

A parede celular é uma estrutura complexa, composta por camadas de peptídeoglicano. A porção glicana é formada a partir de junções de ácido N-acetilmurâmico (MurNac ou NAM) e N-acetilglicosamina (GlcNac ou NAG). A porção peptídica da parede celular liga-se aos MurNac da porção glicana, configurando pontes cruzadas de peptídeos, que embora seja variável, a estrutura de aminoácidos, sempre contém cadeias laterais de tetrapeptídeos. É essa estrutura

rígida, com padrão de rede, que permite a alta pressão osmótica intrabacteriana (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008).

A síntese do peptídeoglicano pode ser dividida em três etapas: (1) síntese de precursores solúveis, que se inicia no citoplasma bacteriano, com a formação do Lipídio I e Lipídio II; (2) transporte dos precursores para o lado externo da membrana citoplasmática; (3) polimerização das subunidades do peptídeoglicano (transglicosilações e transpeptidações) (BAUER; DICKS, 2005; GEISEL et al., 2001).

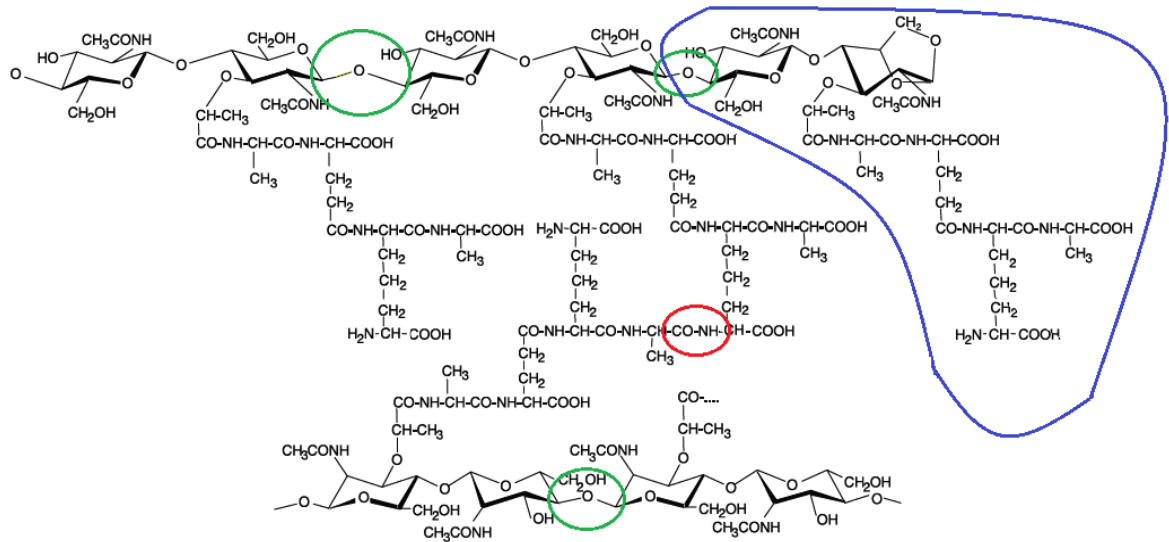
O Lipídio I é formado pela ligação de MurNac-pentapeptídeo a um carreador lipídico transmembrânico undecaprenólico (Figura 1 - A). Nesse complexo (Lipídeo I), a porção da MurNac recebe GlcNac, sendo chamada então de Lipídeo II (Figura 1 - B) (GEISEL et al., 2001; VAN HEIJENOORT, 2007).



**Figura 1** – (A) Lipídeo I (MurNac com a cadeia de pentapeptídeos ligado a um receptor transmembrana undecaprenólico); (B) Lipídeo II (Lipídeo I ligado a GlcNac). Adaptado de VAN HEIJENOORT (2007).

Após o transporte do lipídeo II para a porção externa da membrana citoplasmática, a autolisina quebra as ligações glicosídicas e peptídicas no peptídeoglicano, e então o lipídeo II é ligado à parede celular por transglicosilações e

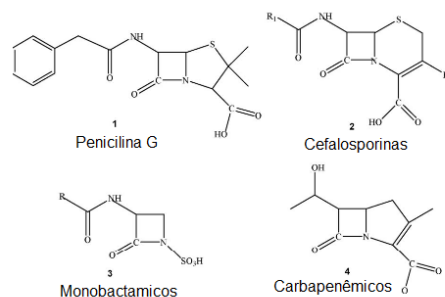
transpeptidações (Figura 2) (GEISEL et al., 2001; TRABULSI, 2004; VAN HEIJENOORT, 2007).



**Figura 2** – Estrutura do peptidoglicano. Notar em verde as ligações glicosídicas; em vermelho as ligações peptídicas e em azul o monômero que compõe o peptídeglicano, GlcNac - MurNac com a cadeia lateral de tetrapeptídeos. Adaptado de VOLLMER et al., (2008).

### 1.3 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos são os antibióticos mais utilizados na prática clínica, principalmente em infecções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* (BUSH; FISHER, 2011). São agentes bactericidas que possuem um anel  $\beta$ -lactâmico ligado a um anel de tiazolidina e uma cadeia lateral que é variável (Figura 3). Exercem seu efeito antimicrobiano impedindo a formação da parede celular bacteriana (BABIC et al., 2006).

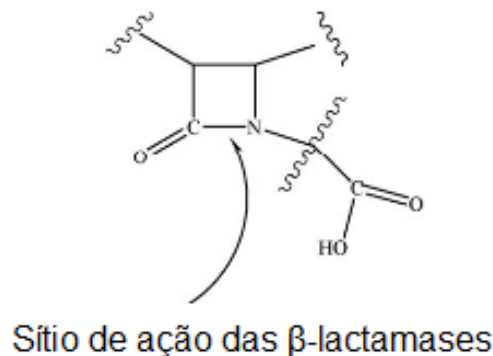


**Figura 3** – Estrutura química dos  $\beta$ -lactâmicos. O anel betalactâmico é representado um quadrado. Adaptado de BABIC et al., (2006).

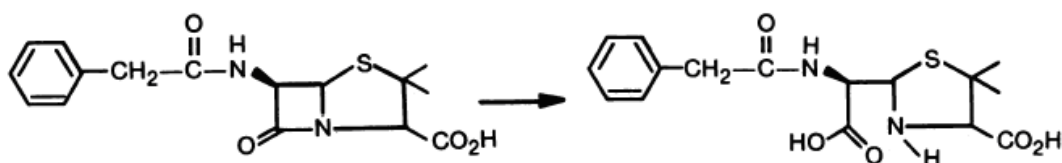
Na formação da parede celular bacteriana, um grupo de enzimas denominadas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs - *penicillin-binding-proteins*) tem ação bifuncional, atuando como glicosiltransferases e transpeptidases. Os  $\beta$ -lactâmicos tem como alvo as PBPs, impedindo que estas atuem como transpeptidases e, portanto o estabelecimento da ponte peptídica entre resíduos de ácido N-acetilmurâmico. Isso faz com que a parede celular perca sua estabilidade e rigidez, predispondo a célula à lise osmótica (DEROUAUX et al., 2011).

#### 1.4 Resistência a $\beta$ -lactâmicos

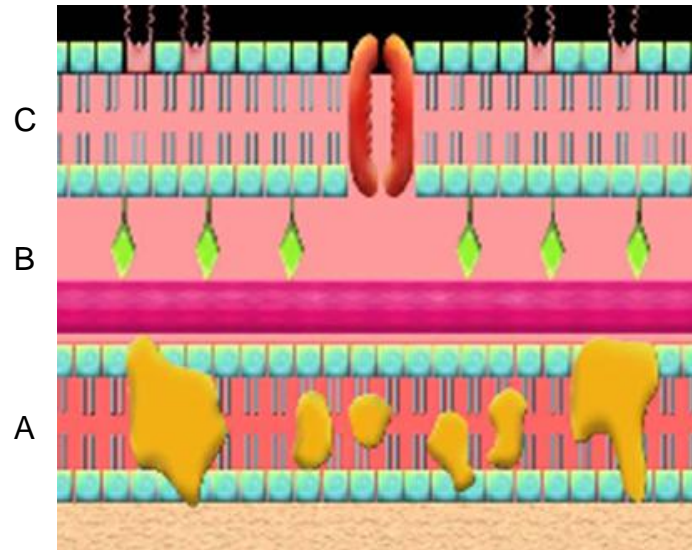
Em bacilos Gram-negativos o mais eficiente e importante mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos se deve à produção de  $\beta$ -lactamases, que tem a capacidade de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (Figuras 4 e 5), impossibilitando a ligação do antibiótico às PBPs (BUSH; JACOBY, 2010; PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002). Um dos fatores que permitem tal eficiência é a localização dessas enzimas no espaço peri-plasmático, região limitada pelas membranas interna e externa em Gram-negativos (Figura 6).



**Figura 4** – Sítio de ação das enzimas  $\beta$ -lactamases. Adaptado de BABIC et al., (2006).



**Figura 5** – Hidrólise da benzilpenicilina por uma beta-lactamase. Reproduzido de BUSH, (1988).



**Figura 6** - Diagrama esquemático do envoltório celular de um Gram-negativo. A- membrana interna; B- espaço peri-plasmático; C- membrana externa. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention.

#### 1.4.1 Classificação das $\beta$ -lactamases

Atualmente as  $\beta$ -lactamases são classificadas de duas maneiras diferentes (Quadro 1). Na classificação de Ambler (1980) são agrupadas com base na estrutura e sequência de aminoácidos: serina- $\beta$ -lactamases e metalo- $\beta$ -lactamases (AMBLER, 1980). Na classificação Bush e colaboradores (1995) são agrupadas conforme semelhanças na estrutura, sequência de aminoácidos e propriedades bioquímicas (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

**Quadro 1** – Classificação das  $\beta$ -lactamases

Bush-Jacoby	Ambler	Características	Enzimas
1	C	Hidrólise de cefalosporinas e cefamicinas, geralmente com altos valores de <i>k<sub>cat</sub></i> que penicilinas; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam; alta afinidade por aztreonam.	AmpC, CMY-2; FOX-1; MIR-1
1e	C	Hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de espectro expandido, monobactâmicos; não inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam.	GC1; CMY-37;
2a	A	Hidrólise eficiente de penicilinas; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	PC1 e outras penicilinases de estafilococos;
2b	A	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam	SHV-1;TEM-1; TEM-2; TLE-1; (TEM-90);
2be	A	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de espectro expandido, monobactâmicos; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	ESBLs: CTX-M-15; CTX-M-44; PER-1; SFO-1; SHV-5; TEM-10; TEM-26; VEB-1;
2br	A	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração; não são bem inibidas por ácido clavulânico.	IRTs: TEM-30; TEM-76; TEM-103; SHV-10; SHV-26;
2ber	A	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de espectro expandido e monobactâmicos; menos eficientemente inibida por ácido clavulânico e tazobactam.	CMTs: TEM-50; TEM-68; TEM-89;
2c	A	Hidrólise eficiente de carbenicilina; inibidas por ácido clavulânico.	PSE-1; CARB-3
2d	D	Hidrólise eficiente de cloxacilina ou oxacilina; nem sempre inibida por ácido clavulânico.	OXA-1; OXA-10;
2de	D	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de espectro expandido; nem sempre inibida por ácido clavulânico.	ESBLs: OXA-11; OXA-15
2df	D	Hidrólise de carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina; nem sempre inibido por ácido clavulânico.	OXA-23; OXA-48;
2e	A	Hidrólise eficiente de cefalosporinas; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.	CepA;
2f	A	Hidrólise de carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas; pobremente inibidas por ácido clavulânico, pequena inibição por tazobactam.	IMI-1;KPC-2; SME-1; GES-2;
3 <sup>a</sup>	B	Hidrólise de todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de íons metálicos; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	IMP-1; L1; NDM-1; VIM-1;
3b	B	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos; inibidos por EDTA e quelantes de íons metálicos; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	CphA, Sfh-1;

Adaptado de BUSH; JACOBY, (2010).

### 1.5 $\beta$ -lactamases AmpC

A  $\beta$ -lactamase AmpC, detectada em *Escherichia coli*, foi a primeira enzima descrita com capacidade de destruir a penicilina, porém não era referenciada com esse nome em 1940 (JACOBY, G. A., 2009). Na classificação estrutural de (AMBLER, 1980), as AmpCs pertencem à classe C, enquanto na classificação funcional de Bush e colaboradores (1995), pertence ao grupo 1 (JACOBY, G. A., 2009).

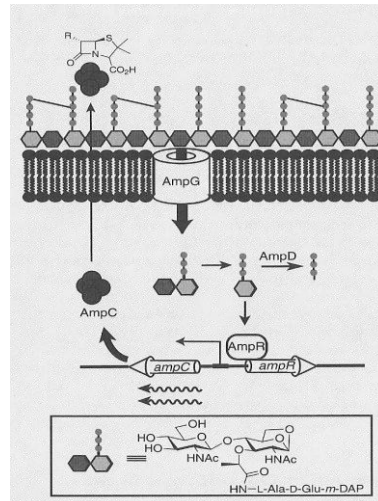


As AmpCs podem ser subdivididas em dois grandes grupos: cromossômicas e plasmidiais. São denominadas AmpCs cromossômicas aquelas codificadas por genes de localização cromossômica e plasmidiais aquelas codificadas por genes de localização plasmidial. Além da localização, diferem pela presença de genes acessórios e reguladores quando a localização é cromossômica, o que não é observado nas plasmidiais. O operon cromossômico contém os genes *ampC*, *ampD*, *ampG* e *ampR* e está presente no chamado grupo CESP – *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*.

A superexpressão de *ampC* em bactérias Gram-negativas pode ocorrer pela desregulação do gene cromossômico ou pela aquisição de plasmídeos ou outros elementos transferíveis, sendo chamado então de AmpC mediadas por plasmídeos (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002). Em muitas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, a expressão basal de AmpC é diminuída, mas é induzível quando há exposição a  $\beta$ -lactâmicos. Essa característica de regulação é observada em operons de localização cromossômica (JACOBY, G. A., 2009). A interrupção da formação parede celular causada pela ação dos  $\beta$ -lactâmicos leva ao acúmulo de monômeros de peptideoglicano no citosol bacteriano. Esses monômeros competem com os oligopeptídeos de ácido UDP-N-acetilmurâmico no sítio de AmpR (regulador de transcrição) fazendo com que haja mudanças conformacionais em AmpR e ativação da transcrição de *ampC*. A célula bacteriana possui uma enzima no citoplasma (AmpD) que remove os monômeros derivados da formação da parede celular, reduzindo as concentrações desses oligopeptídeos, o qual previne a superexpressão de *ampC*, mas o acúmulo de monômeros de peptideoglicano quando há ação de  $\beta$ -lactâmicos é desproporcionalmente maior que a capacidade da AmpD de metabolizá-los (Figura 7) (JACOBY, G. A., 2009). A mutação de *ampD* é a causa mais comum de superexpressão de *ampC*. Mutações em *ampR* são menos comuns, mas podem resultar em cepas com alta produção de AmpC ou hiper induzíveis. AmpG é uma permease que permite a o transporte de oligopeptídeos para a formação da parede celular e conseqüentemente atua indiretamente na regulação de *ampC*. A mutação em *ampG* é menos comum e resulta em baixos níveis de expressão de *ampC* (JACOBY, G. A., 2009).

A regulação de *ampC* é variável entre as diferentes espécies bacterianas. Uma grande diferença entre *E. coli* e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*

é que este microrganismo não tem *ampR*, conseqüentemente a expressão de *ampC* em *E. coli* não é induzível, mas é regulada por promotores e mecanismos de atenuação (JACOBY, G. A., 2009; MULVEY et al., 2005; PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002).



**Figura 7** - Regulação da expressão de *ampC*. Reproduzido de WALSH (2003).

A nomenclatura das AmpCs, assim como a das demais  $\beta$ -lactamases, não tem uma regra fixa, podendo ser uma inferência quanto ao substrato preferencial, a exemplo de CMY (cefamicinas), FOX (cefexitina), MOX (moxalactam), LAT (latamoxef). A designação pode ser também pelo tipo de  $\beta$ -lactamase, sendo exemplo ACT (AmpC type), ACC (Ambler Class C); local aonde foi descoberto sendo exemplo MIR-1 (Mirian Hospital in Providence, R.I.), DHA (Dhahran hospital in Saudi Arabia); ou ainda as iniciais do nome do primeiro paciente do qual foi isolada a cepa com o gene descrito: BIL-1 (Bilal) (PHILIPPON et al., 2002).

AmpC plasmidiais têm sido descritas desde 1989 (Quadro 2) (JACOBY, G. A., 2009). Grande parte dos genes que codificam AmpCs plasmidiais foram isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, no entanto também foram encontradas em outros gêneros bacterianos. Enterobactérias produtoras de AmpC estão dentre as maiores preocupações clínicas por serem resistentes a cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração e outros  $\beta$ -lactâmicos com exceção de cefepime, cefpiroma e carbapenêmicos (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002).

**Quadro 2** – Cronologia da descrição de AmpCs plasmidiais

<b>AmpC <math>\beta</math>- lactamases</b>	<b>País de Origem</b>	<b>Ano da publicação</b>	<b>Espécie em que foi isolada</b>
CMY-1	Koréia do Sul	1989	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CMY-2	Grécia	1996	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MIR-1	Estados	1990	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MOX-1	Japão	1993	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LAT-1	Grécia	1993	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
FOX-1	Argentina	1994	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
DHA-1	Arábia	1997	<i>Salmonella</i> Enteriditis
ACT-1	Estados	1997	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ACC-1	Alemanha	1999	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CFE-1	Japão	2004	<i>Escherichia coli</i>

Adaptado de JACOBY, G. A. (2009).

A maior diversidade de enzimas está nas do tipo CMY já tendo sido descritas 98 variedades até o momento. As outras duas com diversidade significativa são ACT e FOX para as quais já foram descritas respectivamente 10 e 9 variedades. (JACOBY, G.; BUSH, 2013). As AmpCs plasmidiais descritas até o momento tiveram origem em genes de localização cromossômica pertencentes a enterobactérias do grupo CESP, e foram mobilizados provavelmente por eventos de transposição (Quadro 3) (SERAL; GUDE; CASTILLO, 2012).

**Quadro 3** – Distribuição das famílias de genes que codificam AmpC plasmidial e espécies bacterianas de provável origem

<b>Famílias de AmpC</b>	<b>Origem Cromossômica</b>
CIT (CMY e LAT)	<i>Citrobacter freundii</i>
DHA	<i>Morganella morganii</i>
ACC	<i>Hafnia alvei</i>
FOX	<i>Aeromonas media</i>
MOX	<i>Aeromonas caviae</i>
EBC (ACT e MIR)	<i>Enterobacter cloacae</i> e/ou <i>Enterobacter asburiae</i>
CFE-1	<i>Citrobacter freundii</i>

SERAL et al., (2012).

### 1.5.1 Detecção de $\beta$ -lactamases AmpC

Alguns trabalhos mostraram alta taxa de falha clínica em pacientes infectados por microrganismos produtores de AmpC, especialmente os que receberam cefalosporinas como tratamento. De oito pacientes infectados com bactérias que apresentavam resistência e que foram tratados com ceftazidima ou cefotaxima, mas sem imipenem, seis faleceram; no entanto, 12 de 14 pacientes infectados com bactérias com mesmo perfil de susceptibilidade, mas que receberam imipenem como terapia definitiva, apresentaram resposta clínica adequada (COUDRON, 2005).

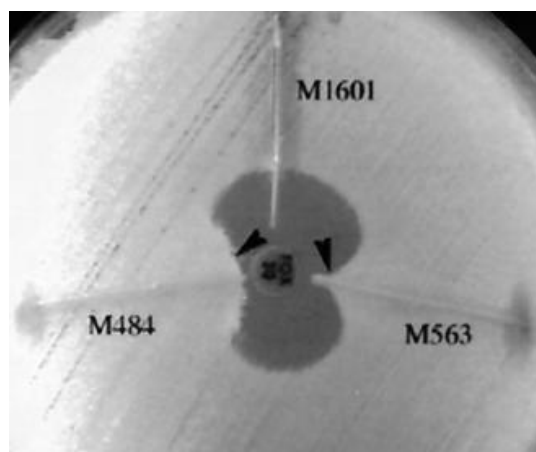
A detecção de microrganismos produtores de AmpC pode ser importante para o ajuste terapêutico e também para controlar a disseminação desses clones; no entanto, não estão disponíveis diretrizes para a detecção de microrganismos que produzam AmpC plasmidial ou organismos que carregam múltiplos genes que codificam  $\beta$ -lactamases (COUDRON, 2005; SONG et al., 2007; JACOBY, G. A., 2009; TAN et al., 2009; KASHIF; YASSIN; HOSNY AEL, 2012; GEYER; REISBIG; HANSON, 2012;).

A partir de estudos relacionados com inibidores de  $\beta$ -lactamases descritos por Bush e colaboradores e Kiener e colaboradores (BUSH; BONNER; SYKES, 1980; KIENER; WALEY, 1978), o ácido fenilborônico (AFB) foi descrito por Beesley e colaboradores (BEESLEY et al., 1983) como bloqueador reversível de enzimas  $\beta$ -lactamases de classe C.

Os isolados produtores de AmpC plasmidial usualmente apresentam sensibilidade reduzida ou resistência à ceftazidima e à cefoxitina, restaurada com adição de AFB aos discos de sensibilidade contendo esses antimicrobianos (COUDRON, 2005; SU; GOTTLIEB; MERLINO, 2012); entretanto carbapenemases do tipo KPC também são inibidas por esse composto (PASTERAN et al., 2008).

Coudron e colaboradores adaptaram o teste tridimensional anteriormente utilizado para detecção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado, para detectar AmpCs. O teste consiste em utilizar um extrato protéico obtido por ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento por cinco vezes consecutivas. A cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 é inoculada em toda a superfície do ágar Muller Hinton e um disco de 30  $\mu$ g de cefoxitina é aplicado. Utilizando-se um bisturi estéril é feita uma fenda no ágar de forma radial a partir de 5 mm da borda do disco de cefoxitina. Cerca de 30  $\mu$ L do extrato protéico preparado anteriormente são dispensados na

fenda sem que haja transbordamento. O conjunto é incubado por 18 a 24 horas antes da leitura. A presença de crescimento bacteriano em direção ao disco de cefoxitina indica positividade do teste (Figura 8). A limitação do teste é que indica apenas degradação enzimática de cefoxitina, mas não é específico para AmpC (COUDRON et al., 2000).

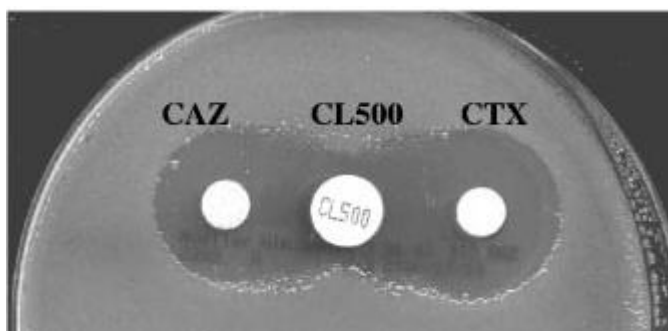


**Figura 8** - Teste tridimensional para detecção de AmpC. As setas indicam amostras positivas para a produção de AmpC. Reproduzido de COUDRON et al., (2000).

Coudron propôs também o uso de discos de cefotetam acrescidos ou não de 400 µg de AFB para a detecção de AmpC. *E. coli* e *K. pneumoniae* que apresentam um aumento do diâmetro do halo de inibição igual ou maior que 5 mm, comparando-se os discos de cefotetam com e sem AFB e não apresentavam sensibilidade à cefoxitina, foram confirmados como produtores de AmpC. Uma das cepas testadas era produtora de KPC-2, sensível à cefoxitina e apresentou diferença de halo de inibição, para cefotetam isoladamente e com AFB, de 3 mm. A principal limitação do trabalho é que apenas nove isolados produtores de AmpC plasmidial foram testados (COUDRON, 2005; SONG et al., 2007).

Song e colaboradores utilizaram discos de 30 µg de cefoxitina e cefotetam com e sem 400 µg de AFB para a detecção de AmpCs plasmidiais, mas não testaram nenhum isolado produtor de KPC ou *E. coli* produtoras de AmpC plasmidial. Um total de 66 *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* sp. produtores de AmpCs plasmidiais apresentaram diferença de halo de inibição, para cefoxitina isoladamente e com AFB, iguais ou maiores que 4 mm, excetuando uma *K. pneumoniae* produtora de DHA-1 cuja diferença foi de 3 mm (SONG et al., 2007).

Outra metodologia utilizada para a detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC é a utilização de discos com cloxacilina, descrita por Ruppé e colaboradores (2006) que se embasa em teste de sinergismo (RUPPE et al., 2006). Os autores propõem um teste em duas etapas, posicionando o disco contendo 500  $\mu$ g de cloxacilina a uma distância borda a borda dos discos de cefotaxima e ceftazidima igual ao raio do halo de inibição mais 1 cm (Figura 9), o que contrasta com a indicação do fabricante dos discos de cloxacilina, que indica 1 cm de distância borda a borda como padrão a ser utilizado. A principal limitação do teste é não terem sido testadas cepas produtoras de KPC, uma vez que esse grupo de enzimas degrada eficientemente cefalosporinas de terceira geração e é inibido por AFB, o que pode resultar testes falsamente positivos.



**Figura 9** - Teste de potenciação com cloxacilina em *K. pneumoniae* produtora de AmpC plasmidial DHA-1. CAZ- ceftazidima; CL500 – cloxacilina; CTX – cefotaxima. Reproduzido de RUPPE et al., (2006).

Tan e colaboradores utilizaram a discos de 30  $\mu$ g de cefoxitina com e sem 400  $\mu$ g de AFB, e discos de 30  $\mu$ g cefoxitina com e sem 200  $\mu$ g de cloxacilina e discos de 30  $\mu$ g de cefoxitina com ambos compostos. A combinação cefoxitina e cloxacilina apresentou as melhores sensibilidade e especificidade. Utilizando-se uma diferença mínima de diâmetros igual a 4 mm a especificidade e a sensibilidade foram de 95%. Utilizando-se uma diferença mínima de diâmetros igual a 5 mm a especificidade e a sensibilidade foram respectivamente 92% e 98%. A principal limitação do trabalho é não ter testado isolados produtores de KPC (TAN et al., 2009).

Recentemente uma metodologia para detecção de AmpCs foi proposta por Kashif e colaboradores (KASHIF et al., 2012). O salicilato de sódio induz a expressão do operon *marRAB* em bactérias Gram negativas, fazendo com que a concentração inibitória mínima para alguns antibióticos aumente. No entanto, em

isolados com superexpressão de *ampC* a adição de salicilato de sódio a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos causa a redução da concentração inibitória mínima, que é devido a repressão da expressão de *ampC* pelo salicilato de sódio.

A detecção fenotípica de AmpC não permite a distinção entre os diferentes tipos de enzimas; por isso se faz necessária a utilização de métodos moleculares para a caracterização dos genes responsáveis pela codificação dessas enzimas.

Perez-Perez e colaboradores desenvolveram uma PCR multiplex, utilizando seis pares de iniciadores, a qual permite a detecção dos diferentes grupos de AmpCs plasmidiais; entretanto, por ter sido concebido há 10 anos e ter havido descrição de várias AmpCs desde então, o método não é capaz de detectar todas as variantes dos diferentes grupos (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002).

Dallenne e colaboradores (2010) propuseram um conjunto de PCRs capazes de detectarem as  $\beta$ -lactamases mais importantes na prática clínica. Uma dessas reações detecta simultaneamente todos os genes AmpC plasmidial. O método proposto detecta os grupos de genes que codificam AmpCs plasmidiais CIT, EBC, DHA, ACC, MOX e FOX, mas não tem controle interno (DALLENE et al., 2010).

Zhu e colaboradores desenvolveram uma reação baseada em técnica de PCR multiplex assimétrica e microarranjo. Nessa metodologia são realizados dois ciclos de PCR para gerar o acúmulo de produtos para a hibridização no ensaio de microarranjo, onde são pesquisados 10 genes de resistência (ESBLs e AmpCs) e concomitantemente realiza a tipagem de seis mutações pontuais no gene *bla<sub>SHV</sub>* (ESBL) (ZHU et al., 2007).

Recentemente Geyer e colaboradores propuseram o uso da PCR multiplex em tempo real para a detecção de AmpCs plasmidiais. Foram delineados iniciadores para seis famílias de AmpCs plasmidiais e iniciadores para a amplificação do gene 16S como controle de integridade do DNA analisado (GEYER et al., 2012).

## 2 MOTIVAÇÃO

No Brasil há apenas um relato da detecção de AmpC plasmidial em *E. coli* (PAVEZ et al., 2008), um relato de detecção de *bla*<sub>CMY</sub> em *Salmonella enterica* (PEIRANO et al., 2006), um trabalho com detecção de um isolado de *K. pneumoniae* produtor de *bla*<sub>CMY-2-like</sub> em São Paulo (CAMPANA et al., 2013) e um trabalho de estudo de prevalência não teve sucesso em encontrar AmpC plasmidiais em isolados clínicos de pacientes da cidade do Rio de Janeiro (DA SILVA DIAS et al., 2008). Em contraste, a análise do perfil de sensibilidade de *E. coli* isoladas de amostras de pacientes da comunidade e hospitalizados, atendidos no Fleury Medicina e Saúde, na cidade de São Paulo, no período de 2006 a 2010, evidenciou um aumento sustentado da frequência de *E. coli* resistente à cefoxitina, um marcador para expressão de AmpC plasmidial. Enquanto nos anos de 2006 e 2007 a frequência foi de 0,03% em 91.400 isolados, em 2008 a frequência foi de 0,35% e em 2009 e 2010 as taxas foram respectivamente 0,70% e 0,65%. Uma vez que não houve mudança metodológica, uma das hipóteses para esse aumento é a disseminação de clones ou de genes localizados em transposons ou integrons e transferidos em plasmídeos.



### 3 OBJETIVO

Caracterizar os determinantes genéticos em *E. coli* com fenótipo compatível com produção de AmpC plasmidial.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de AmpCs plasmidiais em *E. coli* isoladas de culturas de urina;
- Avaliar o desempenho do ácido fenilborônico como bloqueador de enzimas AmpC;
- Caracterizar os genes que codificam AmpCs plasmidiais;
- Avaliar a sensibilidade aos carbapenêmicos dos isolados produtoras de AmpC.
- Avaliar a clonalidade dos isolados produtores de AmpC por ERIC-PCR.
- Avaliar a hidrólise de cefoxitina nos isolados que foram resistentes à cefoxitina, nos isolados que apresentaram bloqueio enzimático com ácido fenilborônico e que foram negativos na PCR para genes que codificam AmpCs plasmidiais.
- Avaliar produção de ESBL nos isolados que foram resistentes à cefoxitina, com diferença maior ou igual a 5 mm para cefoxitina e negativos na PCR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem dos isolados

Durante o período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro de 2012, no Fleury Medicina Diagnóstica, um total de 2.494 culturas de urina foram positivas para *E. coli*. Desse total, 109 isolados (4,37%) apresentaram sensibilidade intermediária ou resistência à cefoxitina pelo sistema Vitek2 e foram selecionadas e armazenadas para uso neste estudo. Essa amostragem incluiu amostras de pacientes internados e ambulatoriais. A confirmação do gênero e espécie foi feita primariamente por promoção de crescimento em ágar CPS (bioMérieux) e nos casos em que as colônias não apresentavam a coloração rosa característica, a identificação da espécie foi confirmada por espectrometria de massas utilizando-se o equipamento MALDI-Biotyper (Bruker).

Além dessa amostragem, foram incluídos três *E. coli* produtoras de AmpC plasmidial para a realização dos ensaios de PCR e sequenciamento dos genes (C1101689, C1210549 e C1301628). Esses isolados não foram incluídos nos cálculos de frequência, sensibilidade ou especificidade.

### 4.2 Detecção fenotípica de AmpCs plasmidiais

Foi avaliado o bloqueio enzimático com ácido fenil-borônico, adicionado aos discos de 30 µg de ceftazidima ou cefoxitina (Oxoid). A solução de AFB (Sigma-Aldrich 78181) foi preparada dissolvendo-se 120 mg em 3 ml de DMSO e a seguir adicionando-se igual volume de água grau reagente. A cada disco foram adicionados 20 µL. Os discos foram preparados imediatamente antes do uso (COUDRON, 2005; SONG et al., 2007).

Foi preparada suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de McFarland e semeada sobre placa de ágar Mueller-Hinton com espessura média de 4 mm. Após evaporação do excesso de umidade foram aplicados discos de cefoxitina e ceftazidima com e sem inibidores. Após 18 a 24 horas de incubação a  $36 \pm 1$  °C foram aferidos os diâmetros dos halos de inibição e calculadas as diferenças entre os halos obtidos com e sem inibidores. Foram utilizadas como controle negativo a *E. coli* ATCC 25922 e controle positivo a cepa de *E. coli* produtora de CMY-2-like (PAVEZ et al., 2008).

### 4.3 Detecção de genes que codificam AmpCs

A reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex foi realizada com os iniciadores de (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002) com as seguintes modificações: a reação foi dividida em duas reações multiplex com a adição dos iniciadores para amplificação dos gene 16S, utilizado como controle de rDNA bacteriano.

A primeira reação utilizou iniciadores para detecção de genes que codificam enzimas dos tipos MOX (*bla*<sub>MOX-1</sub>, *bla*<sub>MOX-2</sub>, *bla*<sub>CMY-1</sub>, *bla*<sub>CMY-8</sub> a *bla*<sub>CMY-11</sub>), CIT (*bla*<sub>LAT-1</sub> a *bla*<sub>LAT-4</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> a *bla*<sub>CMY-7</sub>, *bla*<sub>BIL-1</sub>), DHA (*bla*<sub>DHA-1</sub> e *bla*<sub>DHA-2</sub>), ACC (*bla*<sub>ACC</sub>), EBC (*bla*<sub>ACT-1</sub> e *bla*<sub>MIR-1</sub>) e FOX (*bla*<sub>FOX-1</sub> a *bla*<sub>FOX-5b</sub>) e iniciadores que amplificam fragmentos de rDNA 16S e a segunda com iniciadores para detecção de genes que codificam FOX (iniciadores FOX-217-FW e FOX-552-RV, desenvolvidos neste estudo) e MOX (Quadro 4). A temperatura de anelamento ideal para a primeira reação foi de 60°C e para a segunda reação foi de 55°C. Os controles positivos utilizados foram cepas que possuem algum tipo de AmpC cromossômica, conforme citado por Cejas e colaboradores (2012) para *bla*<sub>DHA</sub> foi utilizado um isolado de *Morganella morganii* (D4141434), um isolado de *Aeromonas caviae* (87251942), para *bla*<sub>ACC</sub> um isolado de *Hafnia alveii* (C4171841), para *bla*<sub>EBC</sub> um isolado de *Enterobacter asburiae* (D4040536), para *bla*<sub>CIT</sub> um isolado de *Citrobacter freundii* (D4042263) e para *bla*<sub>FOX</sub> um isolado de *Escherichia coli* (FOX) gentilmente cedida pela professora Dra. Ana Gales. A cepa *Aeromonas caviae* (87251942) foi utilizada primariamente como controle para *bla*<sub>MOX</sub>, no entanto não houve sucesso na amplificação desse controle, sendo utilizado apenas como controle de rDNA 16S (CEJAS et al., 2012).

O DNA genômico foi extraído com kit GE Healthcare Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin. O volume de 1µL da amostra foi submetido à PCR multiplex contendo tampão de PCR 1X (150 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 µM de cada um dos iniciadores (Quadro 4), 1 U de AmpliTaq Gold® LD (Applied Biosystems®) e água grau reagente completando o volume final para 25 µL. A amplificação foi realizada com um ciclo único de 3 minutos à 94°, 35 ciclos de amplificação que consistiu em 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 60°C para a primeira reação e 55°C para a segunda reação, 1 minuto à 72°C. Após os ciclos de amplificação, a reação foi submetida a um ciclo de

7 minutos à 72°C para extensão final. Os fragmentos foram analisados em tampão Tris-Borato-EDTA 1X em gel de agarose à 1% corado com GelRed™.

Outra reação de PCR multiplex foi realizada para a confirmação da amplificação dos genes de resistência utilizando o protocolo de Dallenne e colaboradores (2010), que amplificam grupos de genes que amplificam ACC (*bla*<sub>ACC-1</sub> e *bla*<sub>ACC-2</sub>), FOX (*bla*<sub>FOX-1</sub> a *bla*<sub>FOX-5</sub>), MOX (*bla*<sub>MOX-1</sub>, *bla*<sub>MOX-2</sub>, *bla*<sub>CMY-1</sub>, *bla*<sub>CMY-8</sub> a *bla*<sub>CMY-11</sub>, *bla*<sub>CMY-19</sub>), DHA (*bla*<sub>DHA-1</sub> e *bla*<sub>DHA-2</sub>), CIT (*bla*<sub>LAT-1</sub> a *bla*<sub>LAT-3</sub>, *bla*<sub>BIL-1</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> a *bla*<sub>CMY-7</sub>, *bla*<sub>CMY-12</sub> a *bla*<sub>CMY-18</sub> e *bla*<sub>CMY-21</sub> a *bla*<sub>CMY-23</sub>), EBC (*bla*<sub>ACT-1</sub> e *bla*<sub>MIR-1</sub>). A reação foi modificada adicionando-se iniciadores que amplificam o gene rDNA 16S, utilizado como controle de amplificação. Os controles empregados foram os mesmos utilizados na reação de Perez-Perez e colaboradores (2002) (DALLEENNE et al., 2010).

O DNA genômico foi extraído com o kit GE Healthcare Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit. Um volume de 1µL da amostra foi submetida à PCR multiplex contendo: 1X tampão de PCR (150 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 µM de cada um dos iniciadores (Quadro 4), 1 U de Taq Platinum® (Invitrogen®) e água completando o volume final para 25 µL. A amplificação foi realizada seguindo o perfil cíclico: 10 minutos à 94°, 30 ciclos de amplificação que consistiu em 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 60°C, 1 minuto à 72°C e um ciclo único de 7 minutos à 72°C para extensão final. Os fragmentos foram analisados em tampão Tris-Borato-EDTA 1X em gel de agarose à 1% corado com GelRed™.

**Quadro 4** – Iniciadores para detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo *ampC* plasmidial.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto (pb)	Posição de anelamento	Referências
MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	358–378	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		877–856	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
CITMFD	TGGYCAGAACTGACWGGCAA	462	478–498	Este estudo
CITMRD	TTTCTCYTGAACGYGGCTGGC		939–919	Este estudo
DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	1244–1265	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		1648–1628	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	861–881	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
ACCMR	TTCGCCGAATCATCCCTAGC		1206–1186	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG	302	1115–1135	Este estudo
EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		1416–1396	Este estudo
FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	1475–1496	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		1664–1644	(PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002)
CMY-G1-MOX-FW	GCCGCTGCTCAAGGAGCACA	959	455-474	Este estudo
CMY-G1-MOX-RV	TGGCCAGCATGACGAYGCCG		1413-1394	Este estudo
MIR-ACT-456-FW	GCGCTTTTATCAAACCTGGCAGCCG	597	1386-1407	Este estudo
MIR-ACT-1052-RV	TCAGGAATAAAKGCCACGTAGCTGC		1979-1955	Este estudo
CMY-G2-266-FW	TTAACGGCGTGTGGGCGGC	657	2189-2208	Este estudo
CMY-G2-922-RV	CGCTGCCGTTGATGATCGAATCA		2845-2823	Este estudo
ACC-117-FW	CCAGCCGCTGATGCAGAAGA	855	766-785	Este estudo
ACC-971-RV	ACAATCGGCGTAGCMACGCT		1620-1601	Este estudo
FOX-217-FW	CAGCGCGTCAGCGAGCAGAC	336	917-936	Este estudo
FOX-552-RV	TGCGGCCAGGTGACCAAACAG		1252-1232	Este estudo
rrs-27FW	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	1466	27- 47	(Maiwald, 2004)
rrs-1492RV	GGTTACCTTGTACGACTT		1492- 1473	(Maiwald, 2004)
MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346	744-763	(Dallenne, 2010)
MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC		1089-1070	(Dallenne, 2010)
MultiCaseFOX_for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	162	396-413	(Dallenne, 2010)
MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGGCCAGGTGA		557-540	(Dallenne, 2010)

Continua ...

**Quadro 4** – Iniciadores para detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo *ampC* plasmidial.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto (pb)	Posição de anelamento	Referências
MultiCaseMO X_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	895	3-23	(Dallenne, 2010)
MultiCaseMO X_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA		900-879	(Dallenne, 2010)
MultiCaseDHA _for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997	113-133	(Dallenne, 2010)
MultiCaseDHA _rev	GCTTTGACTCTTTTCGGTATTCG		1109-1088	(Dallenne, 2010)
MultiCaseCIT_ for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538	570-589	(Dallenne, 2010)
MultiCaseCIT_ rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY		1107-1088	(Dallenne, 2010)
MultiCaseEBC _for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683	189-207	(Dallenne, 2010)
MultiCaseEBC _rev	AGCCTAACCCCTGATACA		871-854	(Dallenne, 2010)
JS-CMY-2-1- 25-FW	ATGATGAAAAAATCGWTATGCTGCG	1139	1-25	Este estudo
JS-CMY-2- 1139-20-RV	AGCTTTTCAAGAATGCGCCA		1139-1119	Este estudo
ERIC-1	CAGCCATGAACAACCTGGTGGCG	-	-	(VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991)
ERIC-2	TGCTTTGCGCAGGGAAAGAAGATTCC	-	-	(VERSALOVIC et al., 1991)

R = A + G; Y = C + T; M = A + C; K = G + T; S = G + C; W = A + T; H = A + T + C; B = G + T + C; D = G + A + T; N = A + C + G + T; V = G + A + T.

#### 4.4 Enterobacterial repetitive intergenic consensus - ERIC-PCR

Foi preparada suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de McFarland e 100 $\mu$ L foi submetida à extração de DNA por lise térmica. O volume de 2 $\mu$ L da amostra foi submetido à PCR descrita por Versalovic e colaboradores (1991), com modificações: 1X tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,8), 2 mM de cada desoxinucleotídeo, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5  $\mu$ M de cada um dos iniciadores (ERIC-1 E ERIC-2), 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas - Thermo Scientific®) e água completando o volume final para 25  $\mu$ L. A amplificação foi realizada seguindo o perfil cíclico: 10 minutos à 94<sup>o</sup>, 30 ciclos de amplificação que consistiu em 1 minuto à 94<sup>o</sup>C, 1 minuto à 52<sup>o</sup>C, 8 minutos à 72<sup>o</sup>C com 16 minutos à 72<sup>o</sup>C para extensão final. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em

tampão Tris-Borato-EDTA 1X, em gel de agarose à 1,5% corado com GelRed™. A escala de DNA 1kb plus DNA Ladder Invitrogen® foi utilizada como referência. (VERSALOVIC et al., 1991). A similaridade entre os perfis gerados por ERIC-PCR foi avaliada utilizando-se o programa Bionumerics, com cálculo do coeficiente de Dice, 1% de otimização e tolerância. Foram interpretados como possivelmente relacionados os perfis com similaridade igual ou maior que 85% (CASAREZ et al., 2007).

#### **4.5 Detecção fenotípica de carbapenemases**

Foi preparada suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de McFarland. Essa suspensão foi semeada sobre placa de ágar Mueller-Hinton com espessura média de 4 mm. Após evaporação do excesso de umidade foram aplicados discos de ertapenem, meropenem e imipenem com e sem ácido fenilborônico (TSAKRIS et al., 2011), EDTA (NORDMANN et al., 2011) ou cloxacilina (GISKE et al., 2011). Após 18 a 24 horas de incubação a 37°C foram aferidos os diâmetros dos halos de inibição e calculadas as diferenças entre os halos obtidos com e sem inibidores.

#### **4.6 Teste de hidrólise de cefoxitina**

Foi obtido crescimento bacteriano em placas de ágar LB com disco de cefoxitina (30µg) por 18-24 horas de incubação a 37°C. Foi inoculada uma colônia em 5 mL de caldo TSB com disco de cefoxitina (30µg) antes de ser incubada a 37°C por 18-24 horas. Todo crescimento bacteriano foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano foi ressuscitado em tampão fosfato de potássio a 25 mM, pH 7,0 e a seguir foi mantido em gelo picado. As amostras foram sonicadas em uma potência de 30% por 4 ciclos de 30 segundos com intervalo de 30 segundos entre ciclos no equipamento Branson Digital Sonifier modelo 102 C (Branson) . O produto foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O ensaio foi realizado utilizando-se 1800 µL de solução de cloreto de sódio a 0,85% acrescido de 100 µM do antibiótico e 200 µL do extrato proteico. Foram feitas leituras da solução salina, da solução salina acrescida do antibiótico e dos testes com o extrato enzimático. A

leitura foi realizada em espectrofotômetro Evolution modelo 260 Bio (Thermo Scientific) no comprimento de onda 260nm por 5 minutos de 30 em 30 segundos e por duas horas de 5 em 5 minutos (ANTONIO, 2010). Foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como controle negativo de hidrólise de cefoxitina, pois é produtora de *bla*<sub>SHV-18</sub> e a concentração inibitória mínima para cefoxitina é de 32 µg/ml, provável alteração da permeabilidade e não por produção de enzimas capazes de hidrolizar a cefoxitina. O controle positivo foi realizado com a cepa *Escherichia coli* A7090874, produtora de *bla*<sub>CMY-2</sub>.

#### **4.7 Determinação da concentração inibitória mínima nos isolados falsamente positivos no teste com ácido fenilborônico**

Foram selecionadas 2 a 3 colônias com 18 a 24 horas de crescimento para preparo de suspensão em solução salina na concentração equivalente à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Foi realizada uma diluição de 1:100 da suspensão bacteriana em caldo Muller-Hinton com volume final de 10 mL.

Em placas de 96 poços em formato de “U”, foi diluído o antibiótico (ceftazidima) iniciando-se com a concentração de 32 µg/mL, diluindo-se até 0,03 µg/mL, e deixando-se um volume final em cada poço de 50 µL. A coluna 12 foi utilizada para controle de crescimento bacteriano (sem o antibiótico). Para controle de qualidade foi utilizada a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922.

Foram inoculados 50 µL da suspensão bacteriana diluída (0,1 ml da suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de McFarland diluída em 10 ml de caldo MH) nas placas já contendo o antibiótico com o dobro da concentração, para que haja uma diluição de 1:2 do antibiótico e o mesmo atinja as concentrações desejadas. Após a inoculação, a placa foi incubada a  $36 \pm 1$  °C por 18-24 horas antes da leitura e interpretação utilizando-se os critérios interpretativos do CLSI 2014 e do EUCAST 2014 (CLSI, 2014a; EUCAST, 2014).

#### **4.8 Teste confirmatório para ESBL**

Uma suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, preparada a partir de crescimento puro e com 18 a 24 h, foi semeada sobre placa de ágar Mueller-Hinton com espessura média de 4 mm. Após



evaporação do excesso de umidade foram aplicados discos de ceftazidima e cefotaxima com e sem 10 µg de ácido clavulânico. Após 18 a 24 horas de incubação a 37°C foram aferidos os diâmetros dos halos de inibição e calculadas as diferenças entre os halos obtidos com e sem inibidores. Foram utilizadas como controle negativo a *E. coli* ATCC 25922 e como positivo a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (CLSI, 2013).

#### **4.9 Extração de plasmídeos**

A extração foi realizada segundo a descrição de (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Foi obtido crescimento bacteriano em caldo Mueller Hinton incubado a 37°C por 18 a 24 horas. Um volume de 500 µL da suspensão foi centrifugado por 30 segundos a 16.000 g a 4°C antes da remoção de todo o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de solução I contendo lisozima, glicose e Tris-HCl e a massa bacteriana foi homogeneizada em vortex. A seguir foram adicionados 200 µL da solução II contendo NaOH e SDS e foi realizada a homogeneização cuidadosa por cinco vezes, por inversão. A mistura foi incubada por cinco minutos e a seguir foram adicionados 150 µL da solução III contendo acetato de sódio 3M, e mantida em banho de gelo. A mistura foi homogeneizada por inversão por cinco vezes antes de ser centrifugada a 16.000 g. O sobrenadante (400 µL) foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e a ele foram adicionados 1,0 mL de etanol absoluto antes da homogeneização por inversão. O tubo foi mantido a -20°C por 30 minutos antes de nova centrifugação a 16.000 g. Após desprezar todo o sobrenadante o centrifugado foi dissolvido em 100 µL de solução estéril de acetato de sódio 0,1M e Tris-HCl a 0,05M, a seguir foram adicionados 200 µL de etanol absoluto gelado. A solução foi incubada a -20°C por 20 minutos antes de nova centrifugação a 16.000 x g. O sobrenadante foi removido e descartado. Após toda a evaporação do álcool, o centrifugado foi ressuspensão em 40 µL de tampão TE 1X. Foi feita uma corrida em gel de agarose 0,7% em tampão TBE por 5 horas com 2,9 V/cm e após revelação com GelRed as imagens foram obtidas sob transiluminador UV.

A análise dos tamanhos dos plasmídios foi realizada pela aferição da distância em mm da origem da aplicação até a banda do plasmídio e comparadas de acordo com as distâncias aproximadas, utilizando-se a cepa *E.coli* 39R 861 como referência.

#### **4.10 Amplificação e sequenciamento de genes que codificam AmpCs plasmidiais**

O DNA genômico foi extraído com o kit GE Healthcare Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin. Um volume de 1 µL da amostra foi submetido à PCR contendo tampão de PCR 1X (150 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,0), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 µM de cada um dos iniciadores (JS-CMY-2-1-25-FW e JS-CMY-2-1139-20-RV), 1 U de AmpliTaq Gold® LD (Applied Biosystems®) e água grau reagente completando o volume final para 50 µL. A amplificação foi realizada com um ciclo único de 3 minutos à 94°, 35 ciclos de amplificação que consistiu em 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 55°C, 1 minuto à 72°C. Após os ciclos de amplificação, a reação foi submetida a um ciclo de 7 minutos à 72°C para extensão final. Os fragmentos foram analisados em tampão Tris-Borato-EDTA 1X em gel de agarose à 1% corado com GelRed™.

A purificação do DNA para a reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit GFX (G&E Healthcare). Os produtos amplificados (45 µL) foram misturados a 250 µL de tampão de captura e a solução resultante foi transferida para tubo com coluna de sílica. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 30 s. Foram pipetados 250 µL de tampão de lavagem a cada coluna e centrifugados 12.000 g por 30 s e a seguir a o tubo contendo as soluções coletadas foram descartados. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e a cada uma das colunas foram adicionados 30 µL de tampão de eluição. Após um minuto em temperatura ambiente as colunas foram centrifugadas a 16.000 g por 1 minuto. A concentração de DNA na amostra obtida após purificação foi determinada em equipamento NanoDrop (Uniscience). Quando necessário, a concentração da solução de DNA foi ajustada para 8,0 ng/µL adicionando-se tampão de eluição. As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 tubos de 200 µL. Cada reação contendo 2,0 µL de BigDye versão 3.1 (Applied Biosystems) 1,0 µL de tampão fornecido com o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems), 2,0 µL de solução de iniciador na concentração de 1,6 pmol/µL, e 5,0 µL de solução de DNA na concentração de 8ng/ µL. As condições de sequenciamento foram: 5 min a 96 °C; 30 ciclos de 1 min a 96 °C, 30 s a 50 °C, e 4 min a 60 °C. As reações foram precipitadas adicionando-se 1,0 µL de solução de acetato de sódio (3,0 M; pH 4,6) e 25 µL de etanol absoluto. A mistura incubada à

temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos antes de centrifugação a 2.000 g por 45 minutos. A placa foi invertida sobre papel absorvente, e novamente centrifugada a 150 g por 1 minuto. Foram adicionados a cada tubo 150 µL de etanol a 70% antes de centrifugação a 2.000 g por 15 minutos. A placa foi novamente invertida sobre papel absorvente e centrifugada a 150 g por 1 minuto. Foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada tubo e a seguir a placa foi mantida ao abrigo da luz a -15°C até o momento de sua introdução no sequenciador. Uma vez obtidos os eletroferogramas, a sequência consenso foi determinada utilizando-se o programa DNABaser. Foram elaborados bancos locais utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999), contendo todas as sequências *bla<sub>AmpC</sub>* descritas até o momento. Os números dos depósitos foram obtidos no site Lahey Clinic (JACOBY, G.; BUSH, 2013) e a seguir foram baixados do GenBank.

As sequências obtidas neste estudo foram então comparadas com as sequências contidas nesses bancos locais, utilizando-se o programa BioEdit.

#### **4.11 Cálculos dos parâmetros de desempenho dos testes**

Para os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, foi utilizado o programa Microsoft Office Excel. Todos os parâmetros de desempenho foram calculados considerando como padrão ouro a detecção de genes nos isolados por PCR. Apenas 12 isolados detectados como produtores de AmpC plasmidial pela técnica de PCR foram submetidos ao cálculo como isolados verdadeiramente positivos.

A sensibilidade do teste foi calculada dividindo-se o total de isolados verdadeiramente positivos pela soma dos isolados verdadeiramente positivos e isolados falsamente negativos.

A especificidade do teste foi calculada dividindo-se o total de isolados verdadeiramente negativos pela soma dos isolados verdadeiramente negativos e isolados falsamente positivos.

O valor preditivo positivo foi calculado dividindo-se o total de isolados verdadeiramente positivos pela soma dos isolados verdadeiramente positivos e isolados falsamente positivos.

O valor preditivo negativo foi calculado com o total de isolados verdadeiramente negativos divididos pela soma dos isolados verdadeiramente

negativos e isolados falsamente negativos.

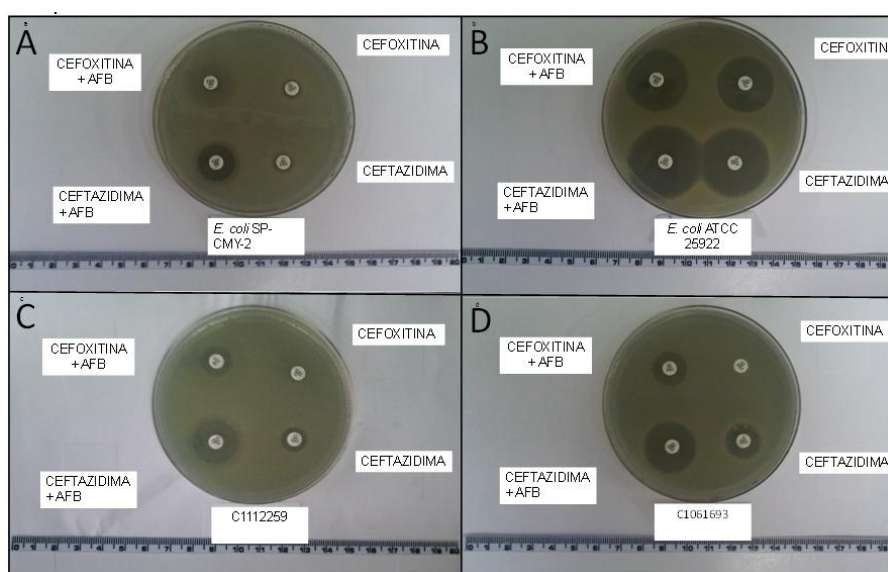
Foram testadas todas as combinações de diferença de halo de inibição de ceftazidima e cefoxitina adicionados de ácido fenilborônico.

## 5 RESULTADOS

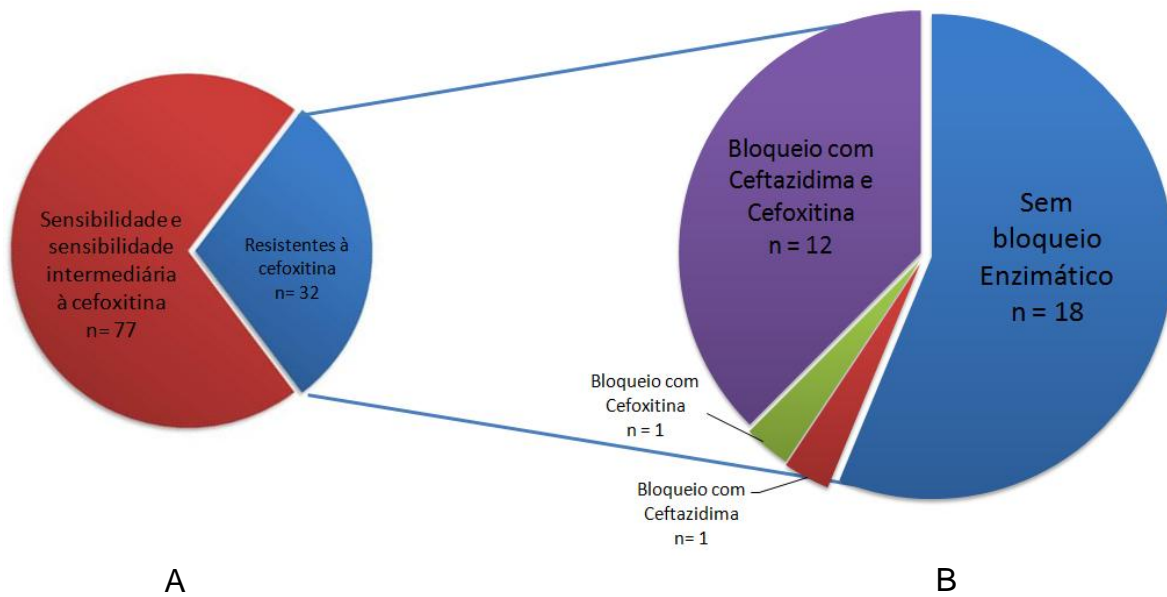
### 5.1 Bloqueio enzimático com ácido fenilborônico

Durante o período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro de 2012, 2.494 culturas de urina foram positivas para *E. coli* no Fleury Medicina Diagnóstica, dos quais 109 isolados, um por paciente, apresentaram sensibilidade intermediária ou resistência à cefoxitina pelo sistema Vitek2 e cartão AST-N104. Desse total, 32 isolados apresentaram resistência à cefoxitina pelo método de disco-difusão.

Dentre os 32 isolados com resistência à cefoxitina, confirmada por disco-difusão, um isolado apresentou bloqueio enzimático positivo apenas para cefoxitina e apenas um para ceftazidima. Doze isolados apresentaram bloqueio enzimático com ambos os substratos. Foram considerados positivos para o bloqueio com AFB isolados que apresentaram um mínimo de 5 mm de diferença entre os halos de inibição obtidos com o disco de antibiótico adicionado de AFB e com o antibiótico puro (Figura 10 e 11).



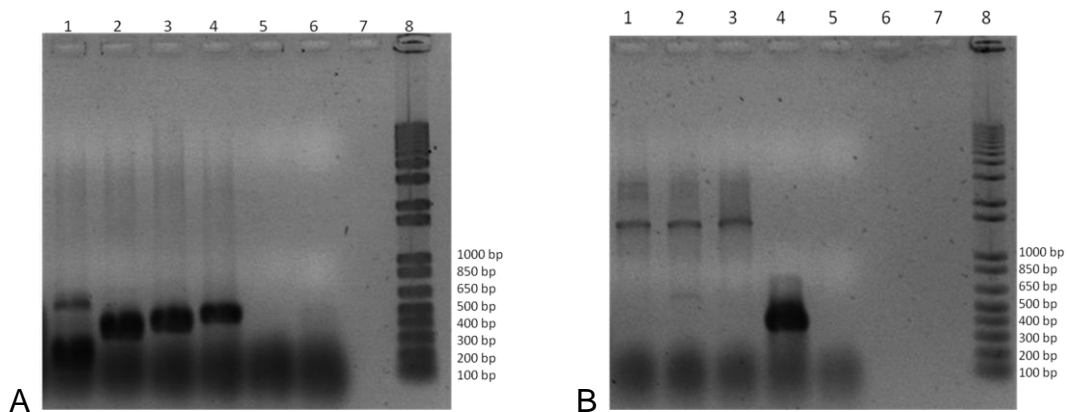
**Figura 10** – Testes de bloqueio enzimático com ácido fenilborônico. A- *E. coli* produtora de CMY-2; B- *E. coli* ATCC 25922; C- Isolado C1112259 com diferenças de halos de 8 mm para cefoxitina e 9 mm para ceftazidima; D- Isolado C1061693 com diferenças de halos de 7 mm para cefoxitina e 10 mm para ceftazidima.



**Figura 11** – Distribuição das *E.coli* segundo perfil de sensibilidade para cefoxitina por disco-difusão (A) e bloqueio enzimático com ácido fenilborônico (AFB) considerando-se positivo se a diferença de halos de inibição com e sem AFB foi igual ou maior que 5 mm (B).

## 5.2 Otimização das reações multiplex para detecção de genes *bla*<sub>ampC</sub>

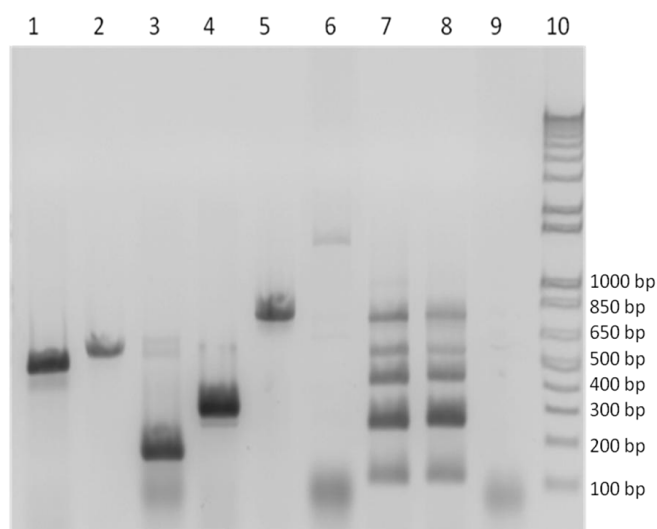
As concentrações ótimas de reagentes e ciclos de amplificação foram padronizadas com o termociclador Veriti (Applied Biosystems) e a DNA polimerase AmpliTaq Gold LD (Applied Biosystems). Nessas condições de reação foi possível amplificar fragmentos dos tamanhos esperados com cepas de referência que albergavam os genes dos grupos CIT, EBC, DHA, ACC, assim como houve amplificação adequada do gene rDNA 16S nos isolados sem genes que codificam AmpCs plasmidiais (Figura 12).



**Figura 12** – Modificação da PCR multiplex de Perez-Perez, 2002. A) eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR multiplex para *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>EBC</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>DHA</sub> e rDNA 16S. 1- cepa D4042263 *bla*<sub>CIT</sub> (462 bp); 2- cepa D4040536 *bla*<sub>EBC</sub> (302 bp); 3- cepa C4171841 *bla*<sub>ACC</sub> (346 bp); 4- cepa D4141434 *bla*<sub>DHA</sub> (405 bp); (5) e (6) - controles negativos; 7 – canaleta vazia; 8 - escala de referência 1 kb plus

(Invitrogen). B) eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR multiplex para *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub> e rDNA 16S. 1- cepa C4171841 *bla*<sub>ACC</sub>; 2- cepa D4040536 *bla*<sub>EBC</sub>; 3- cepa D4042263 *bla*<sub>CIT</sub>; 4- cepa FOX *bla*<sub>FOX</sub> (336 bp); 5- controle negativo (H<sub>2</sub>O); 6 e 7 – Canaletas vazias, 8 – Escala de referência 1 kb plus (Invitrogen). Notar amplificação do fragmento referente ao gene rDNA 16S (1492 bp) nas canaletas 1,2 e 3 e sua ausência no controle negativo (água) e amplificação de banda inespecífica no controle para *bla*<sub>CIT</sub> com o peso de aproximadamente 200 bp.

O protocolo descrito por Dallenne e colaboradores (2010) para a amplificação de fragmentos de *bla*<sub>ampC</sub>, adicionado de iniciadores para detecção de rDNA 16S (controle interno) permitiu a detecção dos genes que codificam AmpCs plasmidiais em todas as cepas de referência utilizadas neste trabalho. A adição de DNA das diferentes cepas de referência em uma única reação permitiu a detecção de todos os genes que codificam AmpC plasmidial, dos quais estavam disponíveis cepas de referência (Figura 13).



**Figura 13** – Modificação da PCR multiplex descrita por Dallenne, 2010. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR multiplex para *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>EBC</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> e rDNA 16S. 1 - cepa D4042263 *bla*<sub>CIT</sub> (538 bp); 2 - cepa D4040536 *bla*<sub>EBC</sub> (683 bp); 3 - FOX *bla*<sub>FOX</sub> (162 bp); 4 – cepa C4171841 *bla*<sub>ACC</sub> (346 bp); 5 – cepa D4141434 *bla*<sub>DHA</sub> (997 bp); 6 – cepa 87251942 (controle de rDNA bacteriano); 7 e 8 – mistura de todos os controles, 9 - controle negativo (H<sub>2</sub>O), 10 – Escala de referência 1 kb plus (Invitrogen).

### 5.3 Detecção de genes que codificam AmpCs plasmidiais nos isolados clínicos

As reações multiplex originalmente descritas por Dallenne e colaboradores (2010) e Perez-Perez e colaboradores (2002) foram utilizadas para avaliar a presença de genes que codificam AmpCs plasmidiais em todos os isolados incluídos neste estudo. Houve 100% de concordância entre os resultados obtidos com os dois protocolos. De um total de 109 isolados testados, em 12 isolados (Tabela 1) houve amplificação de produtos com tamanho estimado de 538 bp (protocolo de

(DALLENE et al., 2010) modificado) de 462 bp (protocolo de Perez-Perez e colaboradores (2002) modificado), que correspondem a genes *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>CMY</sub> ou *bla*<sub>LAT</sub>. Não foram detectados outros tipos de genes que codificam AmpCs plasmidiais na amostragem analisada e houve amplificação do rDNA 16S em todos os isolados que não albergavam genes que codificam AmpCs plasmidiais.

Considerando-se que esses genes foram detectados apenas em um subgrupo de 12 isolados de uma amostragem inicial de 2.494 isolados, a frequência de genes que codificam AmpCs plasmidiais em *E. coli* isoladas de amostras de urina de pacientes da cidade de São Paulo foi 1,8% em pacientes hospitalizados e 0,46% em pacientes ambulatoriais.

**Tabela 1** – Distribuição dos isolados que apresentaram genes que codificam AmpCs plasmidiais segundo o perfil de sensibilidade à ceftazidima e cefoxitina e bloqueio enzimático com AFB.

Nº do isolado	Halo de inibição (mm) e categoria				Diferença entre halos de inibição*		Resultados de PCR	
	Cefoxitina	Ceftazidima	Cefoxitina	Ceftazidima	Cefoxitina	Ceftazidima	Perez-Perez modificado <sup>§</sup>	Dallenne modificado <sup>§</sup>
C1050854	9	R	14	R	10	9	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1061693	5	R	15	R	10	7	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1060031	10	R	12	R	5	10	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1112259	5	R	11	R	8	9	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1200914	8	R	10	R	8	13	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1270333	5	R	14	R	10	10	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1242478	5	R	12	R	14	17	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C2011471	5	R	10	R	10	15	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1281993	6	R	12	R	9	11	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1270322	5	R	12	R	10	12	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1312699	6	R	19	I	6	6	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>
C1310573	5	R	13	R	7	20	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>	<i>bla</i> <sub>CIT</sub>

Legenda: \* Diferença entre os halos de inibição com e sem a adição de ácido fenilborônico. R = Resistente; I = Sensibilidade intermediária. <sup>§</sup>Os iniciadores amplificam um fragmento de mesmo tamanho para os genes *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>CMY</sub> e *bla*<sub>LAT</sub>.



### **5.3 Correlação entre testes fenotípicos e presença de genes que codificam AmpC plasmidial**

Os resultados dos testes fenotípicos foram avaliados tomando como padrão ouro o resultado das PCRs para genes que codificam AmpCs plasmidiais. Todos os 12 isolados que albergavam genes que codificam AmpCs plasmidiais neste estudo, de um total de 109 testados, foram resistentes à cefoxitina, e não sensíveis à ceftazidima (Tabela 1), segundo os critérios do EUCAST e CLSI (CLSI, 2014b; EUCAST, 2014).

A seguir os resultados das PCRs foram utilizados como padrão ouro para o cálculo dos parâmetros de desempenho dos testes fenotípicos: sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e preditivo negativo.

Foram calculados os parâmetros para a diferença de halos para cefoxitina de 3 mm a 7 mm de diferença e também a combinação de cefoxitina e ceftazidima considerando todas as combinações de diferenças de halo entre os antibióticos puros e acrescidos de AFB.

A menor diferença de halos entre os isolados testados foi de 5 mm, portanto o teste com maior sensibilidade e especificidade foi a combinação de diferença de halos de inibição maiores ou iguais a 5 mm para cefoxitina e ceftazidima. Atingindo 100,0 % de sensibilidade, 100,0% de especificidade, valor preditivo positivo de 100,0% e valor preditivo negativo de 100,0%. Os dados brutos das análises de todos os parâmetros comparados encontram-se no Apêndice A.

### **5.4 Sequenciamento dos genes que codificam AmpCs plasmidiais**

Os quinze isolados positivos na PCR multiplex foram submetidos a uma nova reação de PCR utilizando iniciadores desenvolvidos neste trabalho (JS-CMY-2-1-25-FW e JS-CMY-2-1139-20-RV) e iniciadores descritos por Mata *et al.*;2012. Os produtos obtidos foram purificados e sequenciados com os mesmos iniciadores. As sequências nucleotídicas foram utilizadas para gerar sequências consenso. A seguir essas sequências foram traduzidas em aminoácidos preservando-se a fase de leitura em alinhamento com o gene *bla*<sub>CMY-2</sub> (GenBank X91840), utilizando-se o programa BioEdit versão 7.1.7 (HALL, 1999).

Dentre os 15 isolados testados 14 foram idênticas à CMY-2 e apenas 1 idêntica a CMY-4, apesar de haver uma substituição nessa sequência de nucleotídeos. Foram depositadas no GenBank uma sequência de *bla*<sub>CMY-2</sub> representativa do grupo de 14 isolados e a sequência de *bla*<sub>CMY-4</sub> com os números de acesso KJ488945.1 e KJ496347.1 respectivamente.

## **5.5 Avaliação da sensibilidade aos carbapenêmicos nos isolados produtores de CMY-2**

Em função do fato de que a expressão de AmpC plasmidial quando associada à perda de porinas pode levar à resistência aos carbapenêmicos, todos os isolados que se apresentaram positivos na PCR e tinham o perfil fenotípico característico de AmpC plasmidial foram testados com discos de carbapenêmicos (imipenem, ertapenem e meropenem) adicionados ou não de soluções de ácido fenilborônico, EDTA ou cloxacilina. Dados os isolados produtores de AmpC plasmidial foram sensíveis aos carbapenêmicos utilizando-se os critérios do CLSI ou do EUCAST (CLSI, 2014a; EUCAST, 2014). Nenhum dos isolados apresentou diferença igual ou maior que 5 mm quando da adição de EDTA. Apenas o isolado C1312699 apresentou diferença de halo de inibição quando da adição de AFB ou CLOXA aos discos de meropenem. O mesmo isolado apresentou diferença de 5 mm quando da adição de CLOXA ao disco de ertapenem. Para este isolado as diferenças dos halos de inibição com imipenem adicionado de CLOXA ou AFB foram de 1 mm (Tabela 5).

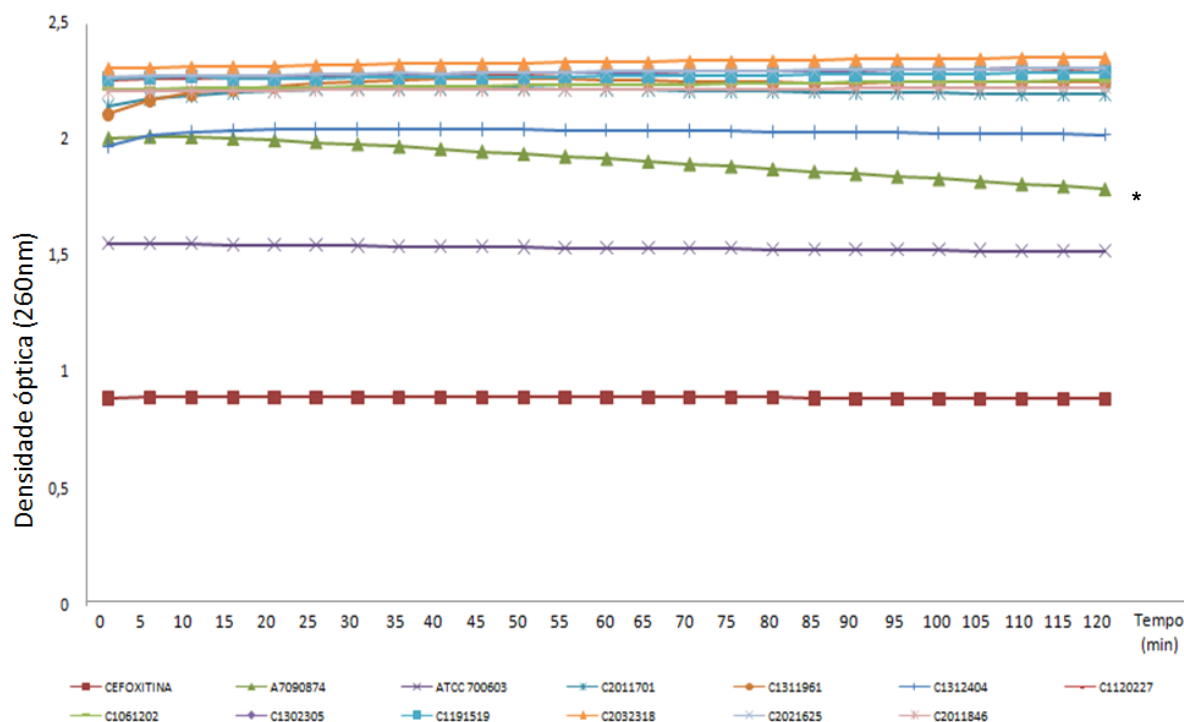
**Tabela 5** – Resultados do teste de sensibilidade a antibióticos por disco difusão e teste fenotípico para detecção de produção de carbapenemases dos isolados produtores de AmpC plasmidial

Nº do isolado	Meropenem					Imipenem					Ertapenem				
	Halo de inibição*	Categoria	Diferença com AFB*	Diferença com CLO*	Diferença com EDTA*	Halo de inibição*	Categoria	Diferença com AFB*	Diferença com CLO*	Diferença com EDTA*	Halo de inibição*	Categoria	Diferença com AFB*	Diferença com CLO*	Diferença com EDTA*
C1050854	26	S	2	2	2	23	S	1	1	1	26	S	1	1	1
C1061693	25	S	2	1	2	23	S	0	0	0	25	S	2	2	1
C1060031	27	S	0	2	0	23	S	2	2	0	25	S	2	2	2
C1112259	26	S	1	1	1	25	S	0	0	0	25	S	2	0	0
C1200914	25	S	0	1	-1	25	S	-2	-1	-1	26	S	1	0	0
C1270333	25	S	0	2	2	25	S	0	-2	1	28	S	2	1	2
C1242478	29	S	1	1	1	27	S	0	0	0	28	S	1	1	0
C2011471	33	S	0	-1	-1	30	S	1	0	0	31	S	1	1	1
C1281993	34	S	1	0	0	31	S	-1	1	0	36	S	-1	-2	0
C1270322	31	S	0	-4	-3	28	S	1	-1	0	30	S	2	0	1
C1312699	25	S	6	6	1	28	S	1	-1	-1	26	S	4	5	3
C1310573	30	S	0	-2	0	27	S	0	0	0	29	S	1	0	1

\* = mm; MEM= Meropenem; IMP= Imipenem; ETP = Ertapenem; AFB = Ácido Feniborônico; CLO= Cloxacilina; EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético.

## 5.6 Avaliação da atividade de hidrólise de cefoxitina nos isolados positivos para o bloqueio com AFB e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs plasmidiais

Dez isolados foram resistentes à cefoxitina por disco difusão, apresentaram diferença de halo maior que 5 mm para cefoxitina com AFB (Tabela 5), mas foram negativos na PCR para genes que codificam AmpCs plasmidiais. Como a negatividade da PCR poderia ser devida à presença de AmpCs plasmidiais ainda não descritas, foram realizados ensaios de hidrólise de cefoxitina. Como controle positivo foi utilizada a cepa *E. coli bla<sub>CMY-2</sub>* A7090874 e como controle negativo foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603, que é produtora de ESBL, mas não degrada cefoxitina. Nenhum dos isolados testados foram capazes de degradar a cefoxitina no tempo de duas horas de incubação, com intervalos de medição de 5 min, enquanto a cepa produtora de CMY-2 (A7090874) hidrolisou a cefoxitina, o que é caracterizado pela redução na densidade óptica final em relação à inicial (Figura 15).



**Figura 15** – Ensaio de hidrólise de cefoxitina. Curva em verde (\*) – *E. coli* A7090874 (CMY-2); curva em roxo – *K. pneumoniae* ATCC 700603 produtora de SHV18 (controle positivo de ESBL). Demais cores isolados positivos para o teste fenotípico para AmpC e negativos por PCR.

## 5.7 Detecção fenotípica de ESBLs nos isolados positivos para o bloqueio com ácido fenilborônico e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs

### 5.7.1 Determinação da concentração inibitória mínima para ceftazidima

Como a falsa positividade do bloqueio com AFB poderia ser devida à presença de ESBLs, foi determinada a concentração inibitória mínima para ceftazidima nos 10 isolados que apresentaram resistência à cefoxitina, diferença maior ou igual a 5 mm no teste com AFB, mas foram negativos na PCR. Enquanto a maioria apresentou sensibilidade quando aplicados os critérios interpretativos do CLSI, a maioria dos isolados foi considerada intermediária ou resistente pelos critérios do EUCAST (Tabela 5). Segundo os critérios do CLSI, isolados com CIM para ceftazidima igual ou maior que 2 µg/mL são considerados potenciais produtores de ESBL; entretanto optamos por executar o método confirmatório em todos os 10 isolados (Tabela 6).

**Tabela 6** – Detecção de ESBL e hidrólise de cefoxitina em isolados falsamente positivos para AmpCs plasmidiais.

Nº dos Isolados	Cefoxitina		PCR		Ceftazidima			Teste Confirmatório para ESBL	Hidrólise da cefoxitina
	Halo (mm)	Categoria	Protocolo Perez-Perez	Protocolo Dallenne	CIM (µg/ml)	CLSI	EUCAST		
C1120227	6	R	Neg	Neg	2	S	I	Neg	Neg
C1061202	7	R	Neg	Neg	1	S	S	Neg	Neg
C1302305	8	R	Neg	Neg	1	S	S	Neg	Neg
C1191519	5	R	Neg	Neg	8	I	R	Positivo	Neg
C2032318	13	R	Neg	Neg	2	S	I	Neg	Neg
C2011701	7	R	Neg	Neg	0,5	S	S	Neg	Neg
C1311961	9	R	Neg	Neg	2	S	I	Neg	Neg
C1312404	11	R	Neg	Neg	8	I	R	Positivo	Neg
C2021625	10	R	Neg	Neg	2	S	I	Neg	Neg
C2011846	7	R	Neg	Neg	2	S	I	Neg	Neg

Legenda: Neg - Negativo; R – Resistente; S – Sensível; I - Intermediário.

### 5.7.2 Detecção de ESBL com bloqueio com clavulanato

Foi realizado teste de confirmação para ESBL (Figura 16) nos isolados que foram resistentes à cefoxitina, apresentaram diferença de halo maior que 5 mm para cefoxitina com AFB, mas foram negativos nas PCRs.

Dentre os dez isolados testados, apenas os isolados C1312404 e C1191519 apresentaram diferença entre os halos igual ou maior que 5 mm quando comparado o disco acrescido o ácido clavulânico com o disco puro (Tabela 5); portanto apenas esses isolados foram considerados produtores de ESBL.



**Figura 16** – Teste confirmatório para ESBL. Foram utilizados discos de cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ). Placa à esquerda – *E. coli* ATCC 25922 (negativo); placa no centro – *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (positivo); placa à esquerda – isolado C1312404 (positivo). Este isolado apresentou positividade no teste fenotípico para AmpC e negatividade na PCR.

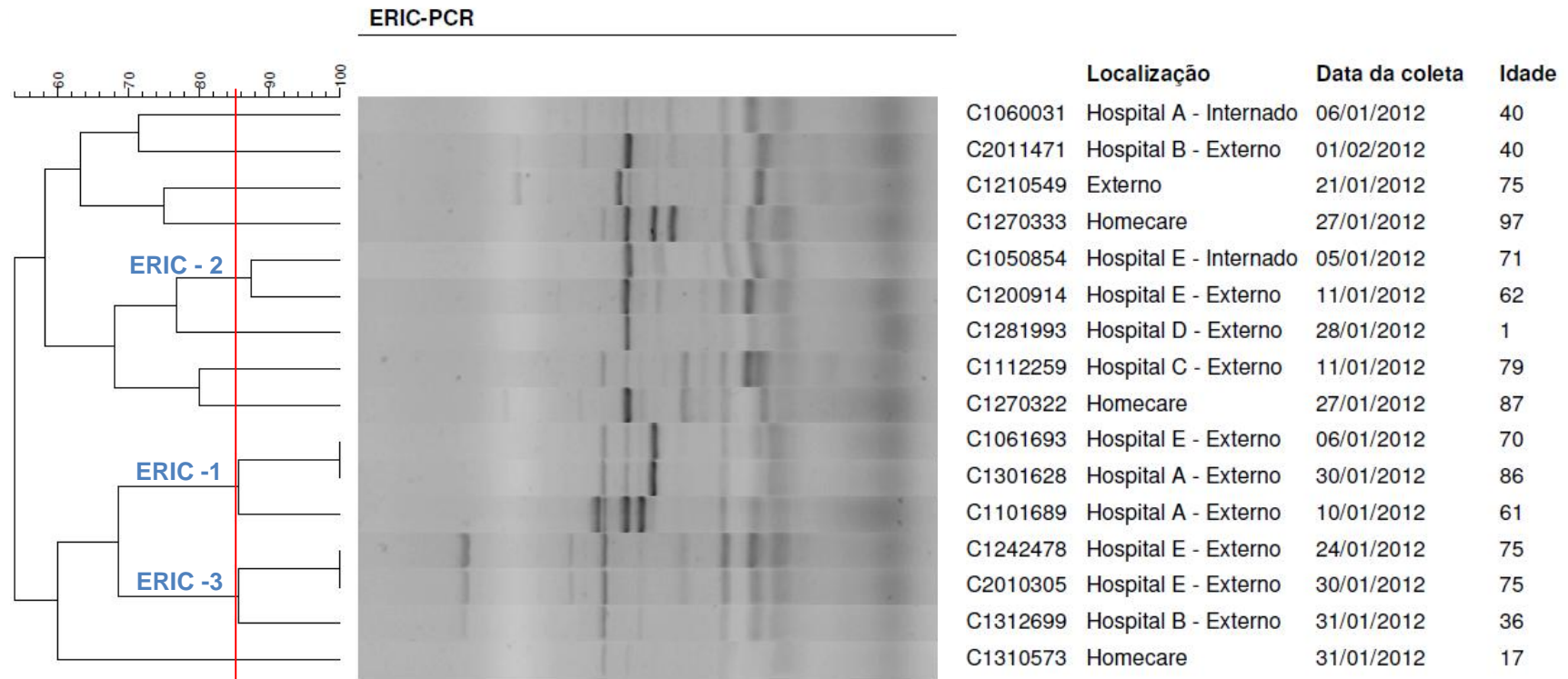
### 5.8 Avaliação da relação clonal entre os isolados que albergam genes *bla*<sub>CMY</sub>

Visando avaliar a relação clonal entre os isolados produtores de CMY, foi realizada extração do DNA e a seguir a reação de ERIC-PCR. A similaridade entre os perfis gerados foi avaliada utilizando-se o programa Bionumerics, com cálculo do coeficiente de Dice, 1% de otimização e tolerância. Foram interpretados como possivelmente relacionados os perfis com similaridade igual ou maior que 85% (CASAREZ et al., 2007). Para fins de controle de qualidade foi incluído na análise o isolado C2010305, cultivado de amostra de cultura de urina do mesmo paciente do isolado C1242478, com intervalo de seis dias entre as culturas.

Houve 100% de similaridade entre os perfis desses dois isolados C2010305, e C1242478 de um mesmo paciente. Foi observada a presença de três grupos clonais que continham dois ou mais isolados, designados ERIC-1, ERIC-2 e ERIC-3. O grupo clonal ERIC-1 apresentou dois isolados com 100% de similaridade e um

terceiro com perfil com cerca de 86% de similaridade. Os dois isolados com 100% de similaridade foram detectados em pacientes externos atendidos em dois hospitais distintos. O grupo clonal ERIC-2 consistiu de dois isolados com 86% de similaridade entre os perfis. Esses isolados foram cultivados de amostras de urina de pacientes de um mesmo hospital E, com intervalo de seis dias entre as culturas, sendo um paciente internado e outro externo. Dois isolados de pacientes externos atendidos nos hospitais B e E foram agrupados em um mesmo grupo clonal ERIC-3 (Figura 17).





**Figura 17** –Avaliação da clonalidade dos isolados que albergam genes *bla<sub>CMY</sub>*. Linha vermelha evidenciando o limite de 85% de similaridade. Grupo clonal ERIC-1 com dois pacientes com 100% de similaridade e um com aproximadamente 86% de similaridade, ERIC-2 com dois isolados com cerca de 86% de similaridade e ERIC-3 com os isolados de paciente de hospital E (utilizados como controle - amostras de mesmo paciente com 100% de similaridade) e um outro isolado com cerca de 86% de similaridade de isolado de paciente de hospital B.

### 5.9 Perfil plasmidial dos isolados que albergam genes *bla*<sub>CMY</sub>

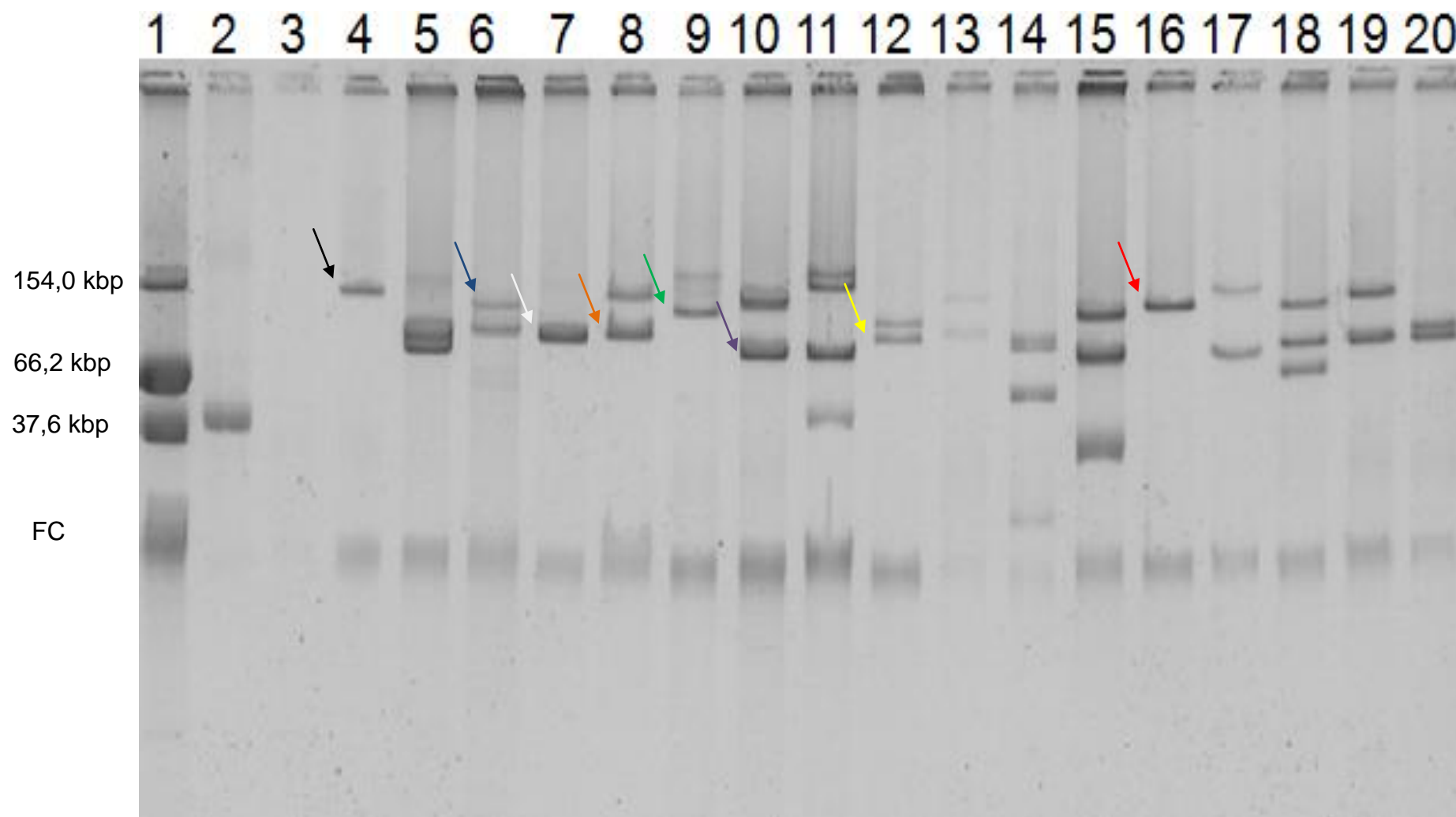
Com o objetivo de avaliar a possível ocorrência de disseminação de genes *bla*<sub>CMY</sub> por transferência de plasmídios, o conteúdo plasmidial de 15 isolados foi avaliado utilizando-se o método da lise alcalina. A extração do conteúdo plasmidial evidenciou que a maioria dos isolados alberga plasmídeos com tamanho igual ou maior que 66,2 kbp (Figura 18). Na extração da cepa controle D4141434 *bla*<sub>DHA</sub> não foram visualizados plasmídeos, mas também não foram visualizados fragmentos de cromossomo, o que pode indicar que a extração não foi adequada para esta cepa. Apesar de haver necessidade de avaliação de transformantes contendo apenas o plasmídio que codifica para AmpC plasmidial para que se possa inferir que há disseminação plasmidial, o perfil plasmidial evidenciou que alguns plasmídios apresentaram peso molecular semelhante. Os isolados C1061693 e C1301628 pertencem ao mesmo clone ERIC-1 segundo o perfil do ensaio de ERIC-PCR e possuem perfis plasmidiais indistinguíveis.

Vários isolados compartilham plasmídeos de peso molecular semelhante. Esses plasmídios foram divididos em grupos segundo a ocorrência em cada isolado (Tabela 7).

**Tabela 7** – Tabela com a distribuição dos plasmídios segundo a ocorrência em cada isolado e peso molecular

Grupo	Nº dos isolados	Tamanho aproximado (kbp)
G1	C1112259; C1210549	154
G2	C1050854; C1060031; C1270333; C1270322	147
G3	C1312699; C1281993	133
G4	C1242478; C2011471	126
G5	C1050854; C1060031	112
G6	C1061693; C1270333; C1301628	105
G7	C1200914; C1310573; C1281993; C1270322	98
G8	C1101689; C1112259; C2011471; C1210549	85

Legenda G1 – grupo 1; G2 – grupo2; G3 – grupo 3; G4 – grupo 4; G5 – grupo 5; G6 – grupo 6; G7 – grupo7 e G8 – grupo 8.



**Figura 18**– Perfil plasmidial de produtores de AmpC plasmidial 1- *E. coli* 39R861 NCTC 50192; 2- *bla*<sub>ACT</sub>; 3- *bla*<sub>DHA</sub>; 4- *bla*<sub>FOX</sub>; 5- *bla*<sub>CMY-2</sub>; 6- C1050854; 7- C1061693; 8- C1060031; 9- C1242478; 10- C1101689; 11- C1112259; 12- C1200914; 13- C1270333; 14- C1310573; 15- C2011471; 16- C1312699; 17- C1210549; 18- C1281993; 19- C1270322; 20- C1301628. FC- fragmentos de cromossomo. FC – Fragmento cromossômico; kbp – mil pares de base. G1 – seta preta; G2 – seta azul; G3 – seta vermelha; G4 – seta verde; G5 – seta laranja; G6 – seta branca; G7 – seta amarela; G8 – seta roxa.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Detecção fenotípica e genotípica de *bla*<sub>ampC</sub>

No Brasil há poucas publicações indexadas sobre a frequência de AmpC plasmidial em enterobactérias. Este estudo foi motivado pela escassez de dados sobre o assunto do Brasil e também pela observação do aumento progressivo da não sensibilidade à cefoxitina, avaliada por sistema de automação Vitek2, em *E. coli* isoladas de amostras de cultura de urina em uma instituição privada da cidade de São Paulo. Nos anos de 2006 e 2007 a média foi de 0,03% em 91.400 isolados, em 2008 a frequência foi de 0,35% e em 2009 e 2010 as taxas foram respectivamente 0,70% e 0,65%. Neste estudo utilizamos a sensibilidade intermediária ou resistência à cefoxitina pelo sistema Vitek2 como triagem inicial das *E.coli* detectadas em amostras de cultura de urina no período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro de 2012, coletadas de pacientes atendidos no Fleury Medicina e Saúde na cidade de São Paulo.

Os métodos de microdiluição automatizada e a disco-difusão tem sido amplamente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica em todo o mundo. Alguns autores têm relatado discrepâncias entre os resultados obtidos pela automação e aqueles obtidos por métodos de referência, como a microdiluição não automatizada e a diluição em ágar (LAT et al., 2011; RITTENHOUSE et al., 1996). Neste estudo foi observada uma discrepância de 35,8 % entre os resultados obtidos com o sistema Vitek2 e a disco-difusão para cefoxitina. Para avaliação da discrepância observada entre a automação e o método convencional seria necessária a disponibilidade dos cartões AST-N104 do sistema Vitek2. A descontinuação da comercialização dos cartões AST-N104, e o fato de que os cartões atualmente comercializados para o sistema Vitek2 no Brasil não tem cefoxitina, impediram a reavaliação dessa discrepância.

O bloqueio enzimático com AFB tem sido utilizado em laboratórios de microbiologia clínica para detecção de AmpCs plasmidiais, particularmente em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (TAN et al., 2009); portanto o conhecimento da especificidade e sensibilidade desse teste é importante na interpretação dos resultados.

Neste estudo um total de 2.494 *E. coli*, isoladas de culturas de urina, foram triadas pela resistência e ou sensibilidade intermediária para cefoxitina. O total de isolados triados com esse critério foi de 109, tendo sido todos submetidos à pesquisa de genes que codificam AmpCs plasmidiais, por PCR.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se protocolos modificados a partir das descrições originais de Perez-Perez e colaboradores (2002) e Dallenne e colaboradores (2010). Visando garantir a não ocorrência de resultados falsamente negativos, neste trabalho acrescentamos iniciadores específicos para rDNA 16S que funcionaram como controle interno.

A PCR de Perez-Perez e colaboradores (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002) apresentou positividade para o grupo de genes CIT (que nesse protocolo detecta fragmento dos genes *bla*<sub>LAT-1</sub> a *bla*<sub>LAT-4</sub> e *bla*<sub>CMY-2</sub> a *bla*<sub>CMY-7</sub>) para 12 isolados e nenhum outro fragmento dos outros genes pesquisados foi amplificado. Após o acréscimo dos iniciadores que amplificam fragmentos de rDNA 16S, a amplificação do fragmento correspondente a *bla*<sub>CIT</sub> passou a amplificar uma banda inespecífica com peso molecular de aproximadamente 200bp, o que não atrapalhou a amplificação do alvo para esse gene que tem o peso molecular de 462bp.

A confirmação da ausência de genes conhecidos que codificam AmpCs plasmidiais foi realizada utilizando-se o protocolo de Dallenne e colaboradores (DALLENE et al., 2010), o qual foi reprodutível e de mais fácil execução, pois foi necessária apenas uma reação multiplex para a amplificação dos fragmentos de todos os genes pesquisados. A PCR de Dallenne apresentou positividade para o grupo de genes CIT (que nesse protocolo detecta fragmentos dos genes *bla*<sub>LAT-1</sub> a *bla*<sub>LAT-3</sub>, *bla*<sub>BIL-1</sub> *bla*<sub>CMY-2</sub> a *bla*<sub>CMY-7</sub>, *bla*<sub>CMY-12</sub> a *bla*<sub>CMY-18</sub> e *bla*<sub>CMY-21</sub> a *bla*<sub>CMY-23</sub>) para os mesmos 12 isolados e não houve amplificação de outros fragmentos de genes que codificam AmpC plasmidial.

Não foi possível amplificar o controle para *bla*<sub>MOX</sub> com a cepa *Aeromonas caviae* (87251942) e a cepa foi utilizada como controle de rDNA e ausência dos genes pesquisados. Uma das limitações deste trabalho é, portanto, não poder excluir com segurança a presença de genes *bla*<sub>MOX</sub> na amostragem analisada, pois não dispúnhamos do controle positivo; entretanto o uso de dois métodos diferentes e dos iniciadores específicos para rDNA16S tornam essa ocorrência improvável.

Considerando-se que de um total de 2.494 culturas de urina positivas para *E. coli*, 109 isolados foram não sensíveis à cefoxitina e desse subtotal 12 foram

positivas por PCR para genes que codificam AmpC plasmidial, a frequência de AmpC plasmidial em *E. coli* isoladas em culturas de urina em pacientes hospitalizados foi 1,8% e de 0,46 para pacientes ambulatoriais. Nossos achados indicam uma frequência diferente do que a descrita por Cejas e colaboradores, que relataram uma frequência de 0,9% de *E. coli* produtoras de CMY-2 em Buenos Aires, Argentina (CEJAS et al., 2012).

No Brasil, há dois estudos publicados sobre a frequência de AmpCs plasmidiais, tendo sido o primeiro realizado no Estado do Rio de Janeiro por Silva e colaboradores (2008). Esses autores que incluíram diversas enterobactérias além de *E. coli*; isoladas de pacientes hospitalizados em 2001 não conseguiram amplificar nenhum gene codificador para esse grupo de enzimas na amostragem (DA SILVA DIAS et al., 2008).

Outro trabalho sobre frequência de AmpC plasmidial no Brasil foi realizado na cidade de São Paulo em isolados de hemoculturas. De um total de 133 enterobactérias isoladas de hemocultura, apenas uma *K. pneumoniae* foi detectada como produtora de *bla*<sub>CMY-2-like</sub>, resultando numa frequência de 0,75% (CAMPANA et al., 2013).

A diferença entre as frequências observadas neste estudo – 1,8% e 0,46% - e aquelas publicadas previamente – 0% e 0,75% - com isolados do Brasil evidenciam provavelmente diferenças na amostragem analisada, pois no Rio de Janeiro foram estudados apenas 42 *E. coli* de diversos materiais clínicos, enquanto neste estudo foram analisados exclusivamente isolados de culturas de urina. Uma limitação do estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro (DA SILVA DIAS et al., 2008) foi a utilização do método de Perez-Perez e colaboradores (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002) sem controle interno, o que não permite excluir a ocorrência de resultados falsamente negativos.

Denisiuk e colaboradores (2013) publicaram em um recente trabalho, que de um total de 5.451 *E. coli* isoladas em hospitais canadenses, foram testadas para a detecção de resistência e a proporção de isolados produtores de AmpC plasmidial detectados foi de 2,9% em 2011 (DENISUIK et al., 2013).

Ortega e colaboradores (2012) fizeram um estudo multicêntrico na Espanha com mecanismos de resistência ao ácido clavulânico em *E. coli*. Dentre os 257 isolados resistentes ao ácido clavulânico 19,5% produziram AmpC plasmidial. As

principais enzimas detectadas foram CMY-2, DHA-1, CMY-30 e CMY-42 (ORTEGA et al., 2012).

Shafiq e colaboradores (2013) em uma publicação de dados de prevalência de AmpC plasmidial no Paquistão, realizaram a triagem dos isolados possivelmente produtores de AmpCs plasmidiais com discos de cefoxitina e todos que se apresentaram com halo de inibição > 18 mm foram retestados fenotipicamente para AmpC plasmidial. Foram isoladas 511 *E. coli* das quais 19,6% foram resistentes para cefoxitina e 6,45% foram confirmadas como produtoras de AmpC plasmidial por método fenotípico, mas não foi realizada confirmação por método molecular (SHAFIQ et al., 2013).

Yilmaz e Colaboradores (2013) realizaram um estudo com 191 isolados de *E. coli* na Índia, no qual os isolados foram triados utilizando cefoxitina, discos de ácido borônico, teste tridimensional e confirmação por ensaios de PCR multiplex. A frequência determinada para *E. coli* produtoras de AmpC plasmidial foi de 10,9%, contrastando com os resultados mais baixos encontrados nas outras localidades. Os grupos com maior número de resultados positivos na PCR foram CIT e MOX que amplificam *bla*<sub>MOX-1</sub>, *bla*<sub>MOX-2</sub>, *bla*<sub>CMY-1</sub>, *bla*<sub>CMY-8</sub> a *bla*<sub>CMY-11</sub>, *bla*<sub>LAT-1</sub> a *bla*<sub>LAT-4</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> a *bla*<sub>CMY-7</sub>, *bla*<sub>BIL-1</sub> (YILMAZ et al., 2013).

## **6.2 Correlação entre testes fenotípicos e presença de genes que codificam AmpC plasmidial**

Tendo em vista que sensibilidade e especificidade elevadas são características desejáveis para métodos de diagnóstico, os testes fenotípicos foram comparados com os resultados das PCRs, possibilitando a realização dos cálculos de seu desempenho.

O melhor resultado encontrado foi a combinação de resistência à cefoxitina, diferença de halos de inibição entre o antibiótico puro e o mesmo acrescido de AFB maior ou igual a 5 mm para cefoxitina e ceftazidima, com sensibilidade de 100,0%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 100,0% para enzimas do tipo CMY. Contudo não existem testes diagnósticos com 100% de sensibilidade e especificidade, seria necessária uma amostragem maior de produtores de AmpC plasmidial para um cálculo mais preciso.

Os achados deste trabalho indicam a necessidade da triagem inicial com cefoxitina e que sejam testados concomitantemente cefoxitina e ceftazidima puras e com AFB para que seja feita detecção adequada de AmpCs plasmidiais em *E.coli*.

Tan e colaboradores (2009) encontraram 89% de sensibilidade e 90% de especificidade no teste de diluição em ágar com cefoxitina para a detecção de AmpC, enquanto que no teste de disco aproximação a sensibilidade foi de 25,2% e a especificidade foi de 99,2%. A melhor sensibilidade encontrada foi de 96% associando-se discos de cefoxitina com cloxacilina e ácido borônico e utilizando-se uma diferença de halo  $\geq 4$ mm de entre o disco puro e o suplementado; no entanto a sensibilidade foi de 88%. Quando utilizado somente a combinação de cefoxitina com cloxacilina, a melhor especificidade encontrada foi de 99%, mas a sensibilidade foi de 88% quando a diferença foi  $\geq 6$  mm. As melhores sensibilidade e especificidade foram obtidas utilizando-se uma diferença  $\geq 4$ mm entre o disco puro e o disco com a combinação com cloxacilina, tendo sido ambas 95%. Utilizando-se cefoxitina e AFB a sensibilidade foi de 94% e a especificidade foi de 89% interpretando como positivas diferenças de halo  $\geq 4$ mm . Esses autores não testaram ceftazidima (TAN et al., 2009).

Da mesma forma que a frequência, os cálculos da sensibilidade e da especificidade são afetados pelo tamanho amostral e critérios utilizados para seleção dos isolados. A publicação de Tan et al. não deixa claro se a amostragem era consecutiva ou não. Outra possibilidade para a discrepância entre os achados da publicação e os deste trabalho pode ser o número de isolados estudados, que foi de 174, enquanto a amostra deste trabalho foi de 109. Outro aspecto é que em nosso estudo optamos por utilizar apenas o AFB em função do menor custo e estabilidade para uso em laboratórios clínicos do que a cloxacilina.

Neste estudo, dentre todas as comparações entre os inibidores e discos puros, o teste que apresentou melhor desempenho para a detecção de AmpC plasmidial foi a combinação de cefoxitina e ceftazidima com e sem a adição de ácido fenilborônico e a interpretação de diferença de halo  $\geq 5$ mm para cefoxitina e ceftazidima, no qual a sensibilidade foi de 100% e especificidade foi de 100,0%. Uma das diferenças entre este estudo e o de Tan e colaboradores, que pode explicar a sensibilidade de 100% por nós encontrada foi a triagem prévia da amostragem pela não sensibilidade à cefoxitina.



Baseado nos achados deste estudo, a detecção de AmpC plasmidial em *E. coli* no Brasil poderia idealmente ser feita triando-se pela não sensibilidade à cefoxitina e a seguir realizando-se testes de bloqueio enzimático com AFB adicionada aos discos de ceftazidima e cefoxitina.

Como o cartão do sistema Vitek2 disponível atualmente ao Brasil não contém cefoxitina, uma alternativa é a triagem inicial da produção de AmpC plasmidial pela resistência à combinação amoxicilina/clavulanato, contida nos cartões do sistema Vitek2 atualmente comercializados no Brasil.

### **6.3 Sequenciamento dos genes que codificam AmpCs plasmidiais**

Visando caracterizar os genes presentes nos isolados positivos nas PCRs multiplex, foram desenvolvidos iniciadores que se anelam ao início e no final dos gene *bla*<sub>CMY</sub>, utilizado-se a aplicação PrimerBlast do NCBI.

A análise das sequências foi feita com a comparação com o banco local, que possui todos os genes que codificam AmpCs plasmidiais publicados até a data de preparação deste manuscrito. Quando as sequências nucleotídicas foram traduzidas, todas os 15 produtos amplificados se apresentaram idênticos àqueles codificados pelos genes *bla*<sub>CMY-2</sub> ou *bla*<sub>CMY-4</sub>.

No Brasil há apenas um relato da detecção de AmpC plasmidial em *E. coli* (PAVEZ et al., 2008), um relato de detecção de *bla*<sub>CMY-2-like</sub> em *Salmonella enterica* (PEIRANO et al., 2006), um trabalho com detecção de um isolado de *K. pneumoniae* produtor de *bla*<sub>CMY-2-like</sub> em São Paulo (CAMPANA et al., 2013) e um trabalho de estudo de prevalência que não teve sucesso em encontrar AmpCs plasmidiais em isolados clínicos de pacientes da cidade do Rio de Janeiro (DA SILVA DIAS et al., 2008). Este trabalho representa, portanto, uma contribuição significativa para o conhecimento da frequência e o tipo de AmpCs plasmidiais em *E. coli* no Brasil.

#### **6.4 Avaliação da sensibilidade aos carbapenêmicos nos isolados produtores de CMY**

Todos os isolados produtores de AmpCs plasmidiais apresentaram halos de inibição considerados sensíveis para os antibióticos carbapenêmicos segundo os critérios do CLSI e do EUCAST, com halos iguais ou maiores que 21 mm para todos os carbapenêmicos.

Apesar do isolado C1312699 ter apresentado diferença de 6 mm entre meropenem com AFB e cloxacilina, e diferença de 5 mm entre ertapenem e cloxacilina, o isolado apresentou-se sensível aos antibióticos carbapenêmicos, o que torna pouco provável a produção de carbapenemases.

Não houve aumento igual ou maior que 5 mm nos outros isolados quando comparados os diâmetros dos halos de inibição de imipenem, meropenem e ertapenem com e sem adição de reagentes. Esses resultados indicam que os isolados que produzem AmpC plasmidial, detectados neste estudo, não são capazes de degradar carbapenêmicos eficientemente.

Sabidamente a combinação de perda de porinas e expressão de AmpC plasmidial concomitantemente pode levar à resistência aos carbapenêmicos (LIU et al., 2008; MAMMERI et al., 2008; POIREL et al., 2004). A circulação, em São Paulo, de *E. coli* produtoras de AmpC plasmidial, que podem sofrer mutações e ter sua expressão de porinas alterada, levando à resistência aos carbapenêmicos, é preocupante.

#### **6.5 Avaliação da atividade de hidrólise de cefoxitina nos isolados positivos para o bloqueio com ácido fenilborônico e negativos na PCR para genes que codificam AmpCs**

Todos os isolados que foram resistentes para cefoxitina pelo método de disco difusão e apresentaram-se positivos no teste fenotípico com halos  $\geq 5$  mm, mas negativos nos testes moleculares para AmpC plasmidial, foram submetidos ao teste de degradação da cefoxitina por espectrofotometria.

O resultado dos controles utilizados no teste com a cepa A7090874 produtora de CMY-2 degrada a cefoxitina, enquanto a cepa ATCC 700603 que é produtora de SHV-18 e tem concentração inibitória mínima para cefoxitina igual a 32  $\mu\text{g/mL}$ , não

consegue degradar a cefoxitina, o que leva a crer que a resistência a cefoxitina para esta cepa possa ser um problema de permeabilidade ao antibiótico.

Todos os isolados deste trabalho que foram submetidos a esse teste não foram capazes de degradar a cefoxitina eficientemente como o controle positivo, um indício que esses isolados não produzem AmpCs plasmidiais.

Não excluímos a possibilidade de que a diferença de halos ocorrida nesses isolados possa ter sido pela inibição de AFB isoladamente; no entanto, apesar de não ter sido testado discos em branco com a adição de AFB, 39 isolados (35,8% do total de isolados testados) não apresentaram diferença nenhuma entre os discos de cefoxitina adicionados de AFB.

## **6.6 Determinação da concentração inibitória mínima para ceftazidima e teste confirmatório para ESBL**

Os mesmos isolados submetidos ao teste de hidrólise da ceftazidima foram submetidos ao teste de sensibilidade a ceftazidima por microdiluição em caldo para verificar se algum dos isolados é resistente ao antibiótico, e concomitantemente sugerir a possibilidade da presença de ESBL.

Os dez isolados testados para o teste de hidrólise de cefoxitina e testados por microdiluição para ceftazidima foram submetidos ao teste confirmatório de ESBL, preconizado pelo CLSI.

Apesar de sete isolados apresentarem valores de concentração inibitória mínima  $\geq$  a 2mg/L, apenas os isolados C1312404 e C1191519 foram positivos no teste apresentando diferença nos halos maiores que 5 mm quando comparado o disco acrescido o ácido clavulânico com o disco puro.

Em nossa amostragem, a triagem por CIM de ceftazidima apresentou elevada taxa de falsa positividade para presença de ESBL, pois apenas dois isolados foram confirmados. Esses dados indicam que a presença de ESBL não pode ser apontada como o fator responsável pela ocorrência de aumento do halo de inibição quando da adição de AFB.

Além da degradação enzimática a resistência à cefoxitina pode ser devida à impermeabilidade por deficiência de porinas ou efluxo. Face aos resultados obtidos nos testes de hidrólise de cefoxitina e produção de ESBL, aventamos a possibilidade

de que o AFB possa ter ação como inibidor de efluxo, resultado em testes falsamente positivos para AmpCs plasmidiais, já que é um inibidor enzimático de AmpCs. Um ensaio que poderia responder esta questão seria a adição ao disco de cefoxitina de inibidores de efluxo a exemplo de carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (PUMBWE; GLASS; WEXLER, 2006).

### **6.7 Avaliação da relação clonal e perfil plasmidial entre os isolados que albergam genes *bla*<sub>CMY</sub>**

A técnica de PFGE (Eletroforese em campos alternados) é considerada o padrão ouro, mas perfis indistinguíveis em ERIC-PCR raramente são não relacionados por PFGE. Neste estudo a PFGE foi substituída pela técnica de ERIC-PCR por ser uma metodologia mais barata e rápida. Segundo Silbert e colaboradores (2004) é uma metodologia reprodutível e com poder discriminatório semelhante ao gerado pelo PFGE (SILBERT et al., 2004), para fins de avaliação preliminar.

A análise dos perfis dos isolados produtores de CMY neste estudo evidenciou três grupos clonais. Dentre os grupos de isolados produtores de AmpC plasmidial, o grupo ERIC-1 possui dois isolados, com 100% de similaridade genética. Estas duas *E. coli* foram isoladas de pacientes idosos, provenientes de dois hospitais distintos A e E. Apesar dos dados disponíveis não indicarem relação epidemiológica entre os pacientes é possível que tenham tido internação hospitalar sem a solicitação de exames complementares.

Os dois outros grupos (ERIC-2 e ERIC-3) possuem isolados de relação clonal de aproximadamente 88% e 86% de similaridade. Sendo que as cepas do grupo ERIC-2 foram isoladas do mesmo hospital E, e o grupo ERIC-3 foram isoladas do hospital E e B.

As cepas que apresentaram relação clonal foram, na maioria, isoladas de pacientes idosos. Esses pacientes carecem de atenção hospitalar com mais frequência. Uma hipótese para a disseminação dos clones na cidade de São Paulo seria a circulação desses idosos em diferentes hospitais.

Outro aspecto que poderia contribuir para o entendimento da epidemiologia de *E. coli* produtoras de AmpC plasmidial seria a determinação do MLST (Multilocus Sequencing Typing). Alguns autores têm demonstrado o predomínio de *E. coli* ST

131 em casos de infecções humanas e disseminação de determinantes de resistência (PALTANSING et al., 2013).

No Brasil não existem relatos de disseminação clonal em isolados produtores de AmpCs plasmidiais. Este trabalho representa, portanto o primeiro relato dessa ocorrência no Brasil.

O menor plasmídeo detectado em múltiplos isolados neste estudo apresentava um tamanho aproximado de 85 kbp. Plasmídios com tamanhos acima de 50 kbp usualmente são conjugativos, podendo ser transferidos entre espécies e gêneros bacterianos (NORMAN; HANSEN; SORENSEN, 2009).

Apesar de haver necessidade de isolamento dos plasmídios em transformantes e caracterização de seus grupos de incompatibilidade para que se possa caracterizar essas estruturas, nossos achados são compatíveis com aqueles de Karczmarczyk e colaboradores (2014) que em uma recente publicação, descreveram um plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF, com tamanho de aproximadamente 85 kbp contendo *bla*<sub>CMY-2</sub>. (KARCZMARCZYK et al., 2014). Os genes *bla*<sub>CMY</sub> também são comumente associados a plasmídios dos grupos de incompatibilidade IncI1 e IncA/C. (ARPIN et al., 2012; CALL et al., 2010; FOLSTER et al., ; HIKI et al., 2013; MARTIN et al.)

Os achados deste estudo de plasmídios com tamanhos acima de 85 kbp, presentes em diferentes isolados, sugerem que possa haver disseminação dos genes *bla*<sub>CMY</sub> por conjugação e será objeto de estudo detalhado no futuro.

## 7 CONCLUSÕES

- A frequência de AmpC plasmidial em *E. coli* foi de 1,8% em pacientes hospitalizados e 0,46% em pacientes ambulatoriais.
- O sequenciamento dos genes que codificam AmpC plasmidial evidenciou tratarem-se de 14 *bla*<sub>CMY-2</sub> e 1 *bla*<sub>CMY-4</sub>.
- A PCR multiplex descrita por Dallenne e colaboradores quando adicionada de iniciadores para controle interno, mostrou-se de fácil execução e reprodutível.
- O melhor desempenho do teste fenotípico com cefoxitina, ceftazidima e ácido fenilborônico, utilizando-se um mínimo de 5 mm de diferença entre o discos adicionados de AFB e puro para cefoxitina e ceftazidima. Utilizando-se esses parâmetros a sensibilidade foi de 100,0%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100 % e valor preditivo negativo de 100%.
- Foi observada a presença e disseminação de três grupos clonais de *E. coli* produtoras de CMY entre hospitais na cidade de São Paulo.
- Os isolados produtores de AmpC plasmidial detectados neste trabalho não são capazes de hidrolisar eficientemente os antibióticos carbapenêmicos.
- A falsa positividade do bloqueio enzimático com cefoxitina e AFB é mais provavelmente devida à expressão de sistemas de efluxo, em função da negatividade do teste de hidrólise de cefoxitina.

## REFERÊNCIAS

- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, n. 1036, p. 321-31, May 16 1980. ISSN 0962-8436 (Print) 0962-8436 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6109327](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6109327) >.
- ANTONIO, C. S. **Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil**. 2010. 113 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARPIN, C. et al. Evolution of an incompatibility group IncA/C plasmid harboring blaCMY-16 and qnrA6 genes and its transfer through three clones of *Providencia stuartii* during a two-year outbreak in a Tunisian burn unit. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1342-9, Mar 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22155825](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22155825) >.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p. 142-56, Jun 2006. ISSN 1368-7646 (Print) 1368-7646 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16899402](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16899402) >.
- BAUER, R.; DICKS, L. M. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. **Int J Food Microbiol**, v. 101, n. 2, p. 201-16, May 25 2005. ISSN 0168-1605 (Print) 0168-1605 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15862882](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15862882) >.
- BEESELEY, T. et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. **Biochem J**, v. 209, n. 1, p. 229-33, Jan 1 1983. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6405733](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6405733) >.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 7, n. 6, p. 1513-23, Nov 24 1979. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=388356](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=388356) >.
- BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 1, p. 109-23, Jan 1988. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3060240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3060240) >.

BUSH, K.; BONNER, D. P.; SYKES, R. B. Izumenolide-a novel beta-lactamase inhibitor produced by *Micromonospora*. II. Biological properties. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 33, n. 11, p. 1262-9, Nov 1980. ISSN 0021-8820 (Print)

0021-8820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6972939> >.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -Lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 65, p. 455-78, Oct 13 2011. ISSN 1545-3251 (Electronic)

0066-4227 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21740228](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21740228) >.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases.

**Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19995920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19995920) >.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, Jun 1995. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7574506](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7574506) >.

CALL, D. R. et al. bla<sub>CMY-2</sub>-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 2, p. 590-6, Feb 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19949054](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19949054) >.

CAMPANA, E. H. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 477-80, 2013. ISSN 1678-4405 (Electronic)

1517-8382 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=24294242](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24294242) >.

CASAREZ, E. A. et al. Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 2, p. 350-64, Aug 2007. ISSN 1364-5072 (Print)

1364-5072 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17650195](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17650195) >.



CEJAS, D. et al. Plasmid-Encoded AmpC (AmpC plasmidial) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers. **Rev Argent Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 182-6, Jul-Sep 2012. ISSN 0325-7541 (Print) 0325-7541 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23102467](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23102467) >.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. 2013.

\_\_\_\_\_. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh Edition; M07-A9 - Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition; and M11-A8 - Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Eighth Edition are followed*. 2014a.

\_\_\_\_\_. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. 2014b.

COUDRON, P. E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4163-7, Aug 2005. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081966> >.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 1791-6, May 2000. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10790101](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10790101) >.

DA SILVA DIAS, R. C. et al. Prevalence of AmpC and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 60, n. 1, p. 79-87, Jan 2008. ISSN 0732-8893 (Print) 0732-8893 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17900845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17900845) >.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 490-5, Mar 2010. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20071363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20071363) >.

DENISUIK, A. J. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **J Antimicrob Chemother**, v. 68 Suppl 1, p. i57-65, May 2013. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23587779](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23587779) >.

DEROUAUX, A. et al. Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 9, p. 1098-105, May 1 2011. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356201> >.

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters - Version 4.0.** 2014.

FOLSTER, J. P. et al. Characterization of bla(CMY)-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 12, p. 1289-94, Dec 2011. ISSN 1556-7125 (Electronic) 1535-3141 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21883005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21883005) >.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-60, Aug 2012. ISSN 1879-0070 (Electronic) 0732-8893 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22656912](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22656912) >.

GEISEL, R. et al. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, n. 10, p. 685-97, Oct 2001. ISSN 0934-9723 (Print) 0934-9723 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11757969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11757969) >.

GEYER, C. N.; REISBIG, M. D.; HANSON, N. D. Development of a TaqMan multiplex PCR assay for detection of plasmid-mediated ampC beta-lactamase genes. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 11, p. 3722-5, Nov 2012. ISSN 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22895035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22895035) >.

GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 4, p. 552-6, Apr 2011. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20597925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20597925)>.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41:95-98**. 1999.

HIKI, M. et al. Diversity of plasmid replicons encoding the bla(CMY-2) gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 3, p. 243-9, Mar 2013. ISSN 1556-7125 (Electronic) 1535-3141 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23489047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23489047)>.

JACOBY, G.; BUSH, K.  **$\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes 2013**.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 1, p. 161-82, Table of Contents, Jan 2009. ISSN 1098-6618 (Electronic) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136439>>.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004. ISSN 1740-1526 (Print) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040260>>.

KARCZMARCZYK, M. et al. Complete nucleotide sequence of a conjugative IncF plasmid from an *Escherichia coli* isolate of equine origin containing bla<sub>CMY-2</sub> within a novel genetic context. **FEMS Microbiol Lett**, Dec 23 2014. ISSN 1574-6968 (Electronic) 0378-1097 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=24386888](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24386888)>.

KASHIF, M. T.; YASSIN, A. S.; HOSNY AEL, D. Detection of AmpC beta-lactamases using sodium salicylate. **J Microbiol Methods**, v. 91, n. 3, p. 354-7, Dec 2012. ISSN 1872-8359 (Electronic) 0167-7012 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23059062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23059062)>.

KIENER, P. A.; WALEY, S. G. Reversible inhibitors of penicillinases. **Biochem J**, v. 169, n. 1, p. 197-204, Jan 1 1978. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=415738](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=415738)>.

LAT, A. et al. Comparison of polymyxin B, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1795-8, May 2011. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21367993](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21367993) >.

LIU, Y. F. et al. Characterization of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* isolates from a university hospital in Taiwan. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 5, p. 1020-3, May 2008. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18292097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18292097) >.

MAMMERI, H. et al. Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) beta-lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 282, n. 2, p. 238-40, May 2008. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18371063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18371063) >.

MARTIN, L. C. et al. Characterization of bla<sub>CMY-2</sub> plasmids in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from food animals in Canada. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 4, p. 1285-7, Feb 2012. ISSN 1098-5336 (Electronic)

0099-2240 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22156427](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22156427) >.

MULVEY, M. R. et al. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 1, p. 358-65, Jan 2005. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15616316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15616316) >.

NORDMANN, P. et al. How to detect NDM-1 producers. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 718-21, Feb 2011. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21123531](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21123531) >.

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1527, p. 2275-89, Aug 12 2009. ISSN 1471-2970 (Electronic)

0962-8436 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19571247](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19571247) >.

ORTEGA, A. et al. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3576-81, Jul 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22491692](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22491692) >.

PALTANSING, S. et al. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an Escherichia coli ST131 clone with a specific mutation in parE. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 40-5, Jan 2013. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22991424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22991424) >.

PASTERAN, F. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1178-80, Jul 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598660> >.

PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1590-2, Dec 2008. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018036> >.

PEIRANO, G. et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 2, p. 305-9, Aug 2006. ISSN 0305-7453 (Print) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16782743](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16782743) >.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, n. 19, p. 1804-13, May 13 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463340> >.

PEREZ-PEREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 2153-62, Jun 2002. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037080> >.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 1, p. 1-11, Jan 2002. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751104> >.

POIREL, L. et al. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 8, p. 3831-3, Aug 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15297541](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15297541) >.

PUMBWE, L.; GLASS, D.; WEXLER, H. M. Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3150-3, Sep 2006. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16940115](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16940115) >.

RITTENHOUSE, S. F. et al. Evaluation of 500 gram negative isolates to determine the number of major susceptibility interpretation discrepancies between the Vitek and MicroScan Walkaway for 9 antimicrobial agents. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 26, n. 1, p. 1-6, Sep 1996. ISSN 0732-8893 (Print)

0732-8893 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8950521](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8950521) >.

RUPPE, E. et al. First detection of the Ambler class C 1 AmpC beta-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 11, p. 4204-7, Nov 2006. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16971653](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16971653) >.

SERAL, C.; GUDE, M. J.; CASTILLO, F. J. [Emergence of plasmid mediated AmpC beta-lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options]. **Rev Esp Quimioter**, v. 25, n. 2, p. 89-99, Jun 2012. ISSN 1988-9518 (Electronic)

0214-3429 (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22707098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22707098) >.

SHAFIQ, M. et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* at tertiary care hospital of Islamabad, Pakistan. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 3, n. 4, p. 267-71, Dec 2013. ISSN 2062-509X (Print)

2062-509X (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=24294496](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24294496) >.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, n. 10, p. 847-51, Oct 2004. ISSN 0899-823X (Print)

0899-823X (Linking). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15518027](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15518027) >.

SONG, W. et al. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 57, n. 3, p. 315-8, Mar 2007. ISSN 0732-8893 (Print)

0732-8893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174510> >.



SU, W. Y.; GOTTLIEB, T.; MERLINO, J. Optimal phenotypic testing of AmpC beta-lactamases using boronic acid solutions. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 1, p. 49-51, Jan 2012. ISSN 1435-4373 (Electronic) 0934-9723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533876> >.

TAN, T. Y. et al. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 146-9, Jan 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18955528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18955528) >.

TRABULSI, L. R. **MICROBIOLOGIA**. 4ª Ed. São Paulo: 2004. 718 p.

TSAKRIS, A. et al. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 8, p. 2804-9, Aug 2011. ISSN 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21632901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21632901) >.

VAN HEIJENOORT, J. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 71, n. 4, p. 620-35, Dec 2007. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18063720](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18063720) >.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, Dec 25 1991. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1762913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1762913) >.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 2, p. 149-67, Mar 2008. ISSN 0168-6445 (Print) 0168-6445 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18194336](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18194336) >.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. ASM Press, 2003. 345 ISBN 978-1-55581-254-6.

YILMAZ, N. O. et al. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Indian J Med Microbiol**, v. 31, n. 1, p. 53-9, Jan-Mar 2013. ISSN 1998-3646 (Electronic) 0255-0857 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23508430](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23508430) >.

ZHU, L. X. et al. Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3707-13, Oct 2007. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17646412](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17646412) >.



## APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios

Nº do Isolado	Halo de Inibição (mm) Ceftazidima	Categoria Ceftazidima	Halo de inibição Ceftazidima + AFB	Halo de Inibição (mm) Cefoxitina	Categoria Cefoxitina	Halo de inibição Cefoxitina + AFB	Diferença de halo ceftazidim a	Diferença de halo cefoxitina	Protocolo Perez-Perez	Resultados Dallenne, 2010
C1070700	28	S	29	13	R	10	1	-3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1042124	28	S	31	24	S	26	3	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1050854	14	R	23	9	R	19	9	10	CIT	CIT
C1051690	25	S	25	12	R	15	0	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1020376	25	S	26	13	R	10	1	-3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1061693	15	R	22	5	R	15	7	10	CIT	CIT
C1061087	21	S	29	16	I	22	8	6	Não Amplificado	Não Amplificado
C1050363	23	S	29	24	S	28	6	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1090898	21	S	29	16	I	18	8	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1092007	28	S	29	17	I	17	1	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1071195	29	S	31	24	S	27	2	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1020975	12	R	14	12	R	12	2	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1030440	11	R	13	15	I	11	2	-4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1060031	12	R	22	10	R	15	10	5	CIT	CIT
C1111553	21	S	30	19	S	25	9	6	Não Amplificado	Não Amplificado
C1160787	24	S	24	16	I	11	0	-5	Não Amplificado	Não Amplificado
C1161969	16	R	16	13	R	15	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1160742	35	S	36	24	S	25	1	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1120411	21	S	25	13	R	10	4	-3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1120227	25	S	28	13	R	19	3	6	Não Amplificado	Não Amplificado
C1141035	23	S	23	11	R	11	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1112259	11	R	20	5	R	13	9	8	CIT	CIT
C1172429	22	S	24	14	R	14	2	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1041125	18	I	21	16	I	17	3	1	Não Amplificado	Não Amplificado

Continua...

## APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios

Nº do Isolado	Halo de Inibição (mm) Ceftazidima	Categoria Ceftazidima	Halo de inibição Ceftazidima + AFB	Halo de Inibição (mm) Cefoxitina	Categoria Cefoxitina	Halo de inibição Cefoxitina + AFB	Diferença de halo ceftazidima	Diferença de halo cefoxitina	Protocolo Perez-Perez	Resultados Dallenne, 2010
C1040112	21	S	27	20	S	18	6	-2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1030371	21	S	30	18	S	18	9	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1021021	26	S	30	20	S	20	4	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1092003	27	S	29	20	S	23	2	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1071621	16	R	18	17	I	19	2	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1061202	23	S	29	13	R	20	6	7	Não Amplificado	Não Amplificado
C1071468	20	I	22	18	S	18	2	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1120741	26	S	26	9	R	5	0	-4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1122203	23	S	24	16	I	17	1	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1120187	25	S	26	13	R	13	1	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1150711	23	S	27	13	R	14	4	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1300009	13	R	17	16	I	19	4	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1110803	28	S	29	18	S	10	1	-8	Não Amplificado	Não Amplificado
C1060677	22	S	24	16	I	20	2	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1060145	21	S	21	19	S	13	0	-6	Não Amplificado	Não Amplificado
C1050571	24	S	24	12	R	10	0	-2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1050398	25	S	26	24	S	25	1	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1302415	28	S	28	17	I	14	0	-3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1130633	18	I	20	17	I	18	2	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1120348	27	S	28	19	S	21	1	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1162023	28	S	28	21	S	16	0	-5	Não Amplificado	Não Amplificado
C1160723	21	S	22	15	I	17	1	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1190095	11	R	11	18	S	16	0	-2	Não Amplificado	Não Amplificado

Continua...

## APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios

Nº do Isolado	Halo de Inibição (mm) Cefotazidima	Categoria Cefotazidima	Halo de inibição Cefotazidima + AFB	Halo de Inibição (mm) Cefoxitina	Categoria Cefoxitina	Halo de inibição Cefoxitina + AFB	Diferença de halo ceftazidim a	Diferença de halo cefoxitina	Protocolo Perez-Perez	Resultados Dallenne, 2010
C1201847	29	S	30	23	S	27	1	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1190018	27	S	27	14	R	15	0	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1191006	28	S	28	15	I	17	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1190377	27	S	28	20	S	19	1	-1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1210619	29	S	30	16	I	18	1	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1211943	26	S	27	20	S	20	1	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1210850	22	S	22	17	I	19	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1210335	23	S	23	20	S	22	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1201110	25	S	25	12	R	10	0	-2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1200914	10,00	R	23	8	R	16	13	8	CIT	CIT
C1302305	23,00	S	30	8	R	16	7	8	Não Amplificado	Não Amplificado
C1191872	26,00	S	25	16	I	18	-1	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1191519	19,00	I	27	14	R	19	8	5	Não Amplificado	Não Amplificado
C2022337	25,00	S	25	5	R	5	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1272410	33,00	S	33	18	S	21	0	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1261321	15,00	R	20	15	I	19	5	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1261577	28,00	S	33	18	S	22	5	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1270333	14,00	R	24	5	R	15	10	10	CIT	CIT
C1280589	35,00	S	35	20	S	23	0	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1281742	33,00	S	37	15	I	24	4	9	Não Amplificado	Não Amplificado
C1270677	28,00	S	28	20	S	20	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1211231	29,00	S	30	26	S	29	1	3	Não Amplificado	Não Amplificado
C1220493	16,00	R	20	5	R	5	4	0	Não Amplificado	Não Amplificado

Continua...

## APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios

Nº do Isolado	Halo de Inibição (mm) Cefotazidima	Categoria Cefotazidima	Halo de inibição Cefotazidima + AFB	Halo de Inibição (mm) Cefoxitina	Categoria Cefoxitina	Halo de inibição Cefoxitina + AFB	Diferença de halo ceftazidim a	Diferença de halo cefoxitina	Protocolo Perez-Perez	Resultados Dallenne, 2010
C1240962	23,00	S	30	21	S	26	7	5	Não Amplificado	Não Amplificado
C1241448	10,00	R	20	16	I	20	10	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1230177	19,00	I	25	15	I	19	6	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1242478	12,00	R	29	5	R	19	17	14	CIT	CIT
C1241751	25,00	S	25	25	S	25	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1241568	26,00	S	29	19	S	19	3	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2011471	10,00	R	25	5	R	15	15	10	CIT	CIT
C1281290	27,00	S	30	17	I	21	3	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1301507	35,00	S	35	22	S	24	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C2032318	32,00	S	33	12	R	25	1	13	Não Amplificado	Não Amplificado
C1301939	25,00	S	26	24	S	25	1	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1290698	25,00	S	28	18	S	19	3	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1300580	25,00	S	25	20	S	22	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1231905	28,00	S	28	25	S	26	0	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C2011701	13,00	R	24	9	R	16	11	7	Não Amplificado	Não Amplificado
C1281335	26,00	S	26	15	I	15	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C1281993	12,00	R	23	6	R	15	11	9	CIT	CIT
C1270322	12,00	R	24	5	R	15	12	10	CIT	CIT
C1230721	27,00	S	29	13	R	13	2	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2010852	26,00	S	27	14	R	10	1	-4	Não Amplificado	Não Amplificado
C1230113	24,00	S	30	15	I	10	6	-5	Não Amplificado	Não Amplificado
C1230573	22,00	S	29	20	S	25	7	5	Não Amplificado	Não Amplificado
C2011842	24,00	S	25	15	I	15	1	0	Não Amplificado	Não Amplificado

Continua...

## APÊNDICE A - Banco de dados dos isolados e resultados de ensaios

Nº do Isolado	Halo de Inibição (mm) Ceftazidima	Categoria Ceftazidima	Halo de inibição Ceftazidima + AFB	Halo de Inibição (mm) Cefoxitina	Categoria Cefoxitina	Halo de inibição Cefoxitina + AFB	Diferença de halo ceftazidim a	Diferença de halo cefoxitina	Protocolo Perez-Perez	Resultados Dallenne, 2010
C1241901	26,00	S	27	15	I	15	1	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2020279	27,00	S	30	16	I	16	3	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2042167	30,00	S	30	20	S	20	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2011876	22,00	S	30	15	I	12	8	-3	Não Amplificado	Não Amplificado
C2031007	23,00	S	30	17	I	18	7	1	Não Amplificado	Não Amplificado
C1312699	19,00	I	25	6	R	12	6	6	CIT	CIT
C1311961	30,00	S	30	13	R	22	0	9	Não Amplificado	Não Amplificado
C1312404	30,00	S	33	9	R	20	3	11	Não Amplificado	Não Amplificado
C1310752	35,00	S	35	23	S	25	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C1310573	13,00	R	33	5	R	12	20	7	CIT	CIT
C2030988	35,00	S	35	19	S	19	0	0	Não Amplificado	Não Amplificado
C2021522	35,00	S	35	18	S	22	0	4	Não Amplificado	Não Amplificado
C2021625	35,00	S	36	12	R	22	1	10	Não Amplificado	Não Amplificado
C2011846	35,00	S	35	13	R	20	0	7	Não Amplificado	Não Amplificado
C2010023	34,00	S	34	19	S	21	0	2	Não Amplificado	Não Amplificado
C2032120	28,00	S	33	17	I	25	5	8	Não Amplificado	Não Amplificado

**APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem**

Nº do Isolado	Hidrólise da cefoxitina	Teste para ESBL	Meropenem								
			Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA	
C1070700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1042124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050854	-	-	26	S	28	28	28	2	2	2	
C1051690	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1020376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1061693	-	-	25	S	27	26	27	2	1	2	
C1061087	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1090898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1092007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1020975	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1030440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060031	-	-	27	S	27	29	27	0	2	0	
C1111553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1161969	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120411	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120227	NÃO HIDROLISA	NÃO ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

**APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem**

Nº do Isolado	Hidrólise da cefoxitina	Teste para ESBL	Meropenem							
			Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1141035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1112259	-	-	26	S	27	27	27	1	1	1
C1172429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1041125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1040112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1030371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1021021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1092003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071621	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1061202	NÃO HIDROLISA	NÃO ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120741	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1122203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1150711	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1300009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1110803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050571	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

**APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem**

Nº do Isolado	Hidrólise da cefoxitina	Teste para ESBL	Meropenem							
			Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1050398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1302415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1130633	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120348	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1162023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160723	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1201847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1191006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210619	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1211943	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1201110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1200914	-	-	25	S	25	26	24	0	1	-1
C1302305	NÃO HIDROLISA	NÃO ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-
C1191872	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...



**APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem**

Nº do Isolado	Hidrólise da cefoxitina	Teste para ESBL	Meropenem							
			Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1191519	NÃO HIDROLISA	ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-
C2022337	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1272410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1261321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1261577	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1270333	-	-	25	S	25	27	27	0	2	2
C1280589	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1270677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1211231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1220493	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1240962	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1241448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1242478	-	-	29	S	30	30	30	1	1	1
C1241751	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1241568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011471	-	-	33	S	3	32	32	-30	-1	-1
C1281290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1301507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

**APÊNDICE B - Resultados de ensaios realizados com os isolados - hidrólise da cefoxitina, teste confirmatório de ESBL e ensaios de bloqueio enzimático com Meropenem**

Nº do Isolado	Hidrólise da cefoxitina	Teste para ESBL	Meropenem							
			Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C2032318	NÃO HIDROLISA	NÃO ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-
C1301939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1290698	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1300580	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1231905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011701	NÃO HIDROLISA	NÃO ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281993	-	-	34	S	35	34	34	1	0	0
C1270322	-	-	31	S	31	27	28	0	-4	-3
C1230721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2010852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1241901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2020279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2042167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...



## APÊNDICE C - Resultados de ensaios realizados com os isolados - ensaios de bloqueio enzimático com Imipenem e Ertapenem

Nº do Isolado	Imipenem								Ertapenem							
	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1070700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1042124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050854	23	S	24	24	24	1	1	1	26	S	27	27	27	1	1	1
C1051690	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1020376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1061693	23	S	23	23	23	0	0	0	25	S	27	27	26	2	2	1
C1061087	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1090898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1092007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1020975	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1030440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060031	23	S	25	25	23	2	2	0	25	S	27	27	27	2	2	2
C1111553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1161969	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120411	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1141035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1112259	25	S	25	25	25	0	0	0	25	S	27	25	25	2	0	0
C1172429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

### APÊNDICE C - Resultados de ensaios realizados com os isolados - ensaios de bloqueio enzimático com Imipenem e Ertapenem

Nº do Isolado	Imipenem						Ertapenem									
	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1041125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1040112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1030371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1021021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1092003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071621	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1061202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1071468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120741	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1122203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1150711	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1300009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1110803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1060145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050571	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1050398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1302415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1130633	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1120348	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1162023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1160723	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

### APÊNDICE C - Resultados de ensaios realizados com os isolados - ensaios de bloqueio enzimático com Imipenem e Ertapenem

Nº do Isolado	Imipenem								Ertapenem							
	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1201847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1191006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1190377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210619	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1211943	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1210335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1201110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1200914	25	S	23	24	24	-2	-1	-1	26	S	27	26	26	1	0	0
C1302305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1191872	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1191519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2022337	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1272410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1261321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1261577	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1270333	25	S	25	23	26	0	-2	1	28	S	30	29	30	2	1	2
C1280589	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1270677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1211231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1220493	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1240962	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

### APÊNDICE C - Resultados de ensaios realizados com os isolados - ensaios de bloqueio enzimático com Imipenem e Ertapenem

Nº do Isolado	Imipenem						Ertapenem									
	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA	Halo de Inibição	Categoria	Halo de inibição com AFB	Halo de inibição com cloxacilina	Halo de inibição com EDTA	Diferença com AFB	Diferença com Cloxacilina	Diferença com EDTA
C1241448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1242478	27	S	27	27	27	0	0	0	28	S	29	29	28	1	1	0
C1241751	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1241568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011471	30	S	31	30	30	1	0	0	31	S	32	32	32	1	1	1
C1281290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1301507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2032318	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1301939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1290698	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1300580	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1231905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1281993	31	S	30	32	31	-1	1	0	36	S	35	34	36	-1	-2	0
C1270322	28	S	29	27	28	1	-1	0	30	S	32	30	31	2	0	1
C1230721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2010852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1230573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2011842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1241901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2020279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...





**APÊNDICE D – Cálculos dos parâmetros de desempenho do teste de detecção de AmpCs plasmidiais com Cefoxitina, ceftazidima e bloqueio enzimático com o ácido fenilborônico.**

AFB ≥ 3 mm FOX E ≥ 4 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	83,51%
+	12	16		VPP	42,86%
-	0	81		VPN	100,00%

AFB ≥ 4 mm FOX E ≥ 3 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	81,44%
+	12	18		VPP	40,00%
-	0	79		VPN	100,00%

AFB ≥ 5 mm FOX E ≥ 3 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	87,63%
+	12	12		VPP	50,00%
-	0	85		VPN	100,00%

AFB ≥ 6 mm FOX E ≥ 3 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	91,67%
		+	-	Especificidade	90,72%
+	11	9		VPP	55,00%
-	1	88		VPN	98,88%

AFB ≥ 3 mm FOX E ≥ 5 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	85,57%
+	12	14		VPP	46,15%
-	0	83		VPN	100,00%

AFB ≥ 4 mm FOX E ≥ 5 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	85,57%
+	12	14		VPP	46,15%
-	0	83		VPN	100,00%

AFB ≥ 5 mm FOX E ≥ 4 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	89,69%
+	12	10		VPP	54,55%
-	0	87		VPN	100,00%

AFB ≥ 6 mm FOX E ≥ 4 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	91,67%
		+	-	Especificidade	92,78%
+	11	7		VPP	61,11%
-	1	90		VPN	98,90%

Continua...

**APÊNDICE D – Cálculos dos parâmetros de desempenho do teste de detecção de AmpCs plasmidiais com Cefoxitina, ceftazidima e bloqueio enzimático com o ácido fenilborônico.**

AFB ≥ 7 mm FOX	PCR	Sensibilidade	83,33%	AFB ≥ 7 mm FOX E ≥ 4 mm CAZ	PCR	Sensibilidade	83,33%		
E ≥ 3 mm CAZ	+	-	Especificidade	93,81%	+	-	Especificidade	94,85%	
+	10	6	VPP	62,50%	+	10	5	VPP	66,67%
-	2	91	VPN	97,85%	-	2	92	VPN	97,87%
AFB ≥ 3 mm FOX	PCR	Sensibilidade	100,00%	AFB ≥ 3 mm FOX E ≥ 7 mm CAZ	PCR	Sensibilidade	91,67%		
E ≥ 6 mm CAZ	+	-	Especificidade	88,66%	+	-	Especificidade	91,75%	
+	12	11	VPP	52,17%	+	11	8	VPP	57,89%
-	0	86	VPN	100,00%	-	1	89	VPN	98,89%
AFB ≥ 4 mm FOX	PCR	Sensibilidade	100,00%	AFB ≥ 4 mm FOX E ≥ 7 mm CAZ	PCR	Sensibilidade	91,67%		
E ≥ 6 mm CAZ	+	-	Especificidade	88,66%	+	-	Especificidade	91,75%	
+	12	11	VPP	52,17%	+	11	8	VPP	57,89%
-	0	86	VPN	100,00%	-	1	89	VPN	98,89%
AFB ≥ 5 mm FOX	PCR	Sensibilidade	100,00%	AFB ≥ 5 mm FOX E ≥ 7 mm CAZ	PCR	Sensibilidade	91,67%		
E ≥ 6 mm CAZ	+	-	Especificidade	91,75%	+	-	Especificidade	92,78%	
+	12	8	VPP	60,00%	+	11	7	VPP	61,11%
-	0	89	VPN	100,00%	-	1	90	VPN	98,90%
AFB ≥ 6 mm FOX	PCR	Sensibilidade	91,67%	AFB ≥ 6 mm FOX E ≥ 7 mm CAZ	PCR	Sensibilidade	83,33%		
E ≥ 5 mm CAZ	+	-	Especificidade	93,81%	+	-	Especificidade	95,88%	
+	11	6	VPP	64,71%	+	10	4	VPP	71,43%
-	1	91	VPN	98,91%	-	2	93	VPN	97,89%

Continua...

**APÊNDICE D – Cálculos dos parâmetros de desempenho do teste de detecção de AmpCs plasmidiais com Cefoxitina, ceftazidima e bloqueio enzimático com o ácido fenilborônico.**

AFB ≥ 7 mm FOX E ≥ 5 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	83,33%
		+	-	Especificidade	95,88%
+		10	4	VPP	71,43%
-		2	93	VPN	97,89%

AFB ≥ 3 mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,0%
		+	-	Especificidade	67,0%
+		12	32	VPP	27,3%
-		0	65	VPN	100,0%

AFB ≥ 4 mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,0%
		+	-	Especificidade	74,2%
+		12	25	VPP	32,4%
-		0	72	VPN	100,0%

AFB ≥ 5 mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,0%
		+	-	Especificidade	83,5%
+		12	16	VPP	42,9%
-		0	81	VPN	100,0%

AFB ≥ 7 mm FOX E ≥ 6 mm CAZ		PCR		Sensibilidade	83,33%
		+	-	Especificidade	96,91%
+		10	3	VPP	76,92%
-		2	94	VPN	97,92%

AFB ≥ 3 mm CAZ e ≥ 3mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	80,41%
+		12	19	VPP	38,71%
-		0	78	VPN	100,00%

AFB ≥ 4 mm CAZ e ≥ 4 mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	84,54%
+		12	15	VPP	44,44%
-		0	82	VPN	100,00%

AFB ≥ 5 mm CAZ e ≥ 5 mm FOX		PCR		Sensibilidade	100,00%
		+	-	Especificidade	90,72%
+		12	9	VPP	57,14%
-		0	88	VPN	100,00%

Continua...

**APÊNDICE D – Cálculos dos parâmetros de desempenho do teste de detecção de AmpCs plasmidiais com Cefoxitina, ceftazidima e bloqueio enzimático com o ácido fenilborônico.**

PCR			Sensibilidade	91,7%
AFB ≥ 6 mm FOX	+	-	Especificidade	86,6%
+	11	13	VPP	45,8%
-	1	84	VPN	98,8%

PCR			Sensibilidade	83,3%
AFB ≥ 7 mm FOX	+	-	Especificidade	89,7%
+	10	10	VPP	50,0%
-	2	87	VPN	97,8%

AFB ≥ 6 mm CAZ e ≥ 6 mmFOX			PCR	Sensibilidade	91,67%
+	11	5	Especificidade	94,85%	
+	11	5	VPP	68,75%	
-	1	92	VPN	98,92%	

AFB ≥ 7 mm CAZ e ≥ 7 mm FOX			PCR	Sensibilidade	83,33%
+	10	2	Especificidade	97,94%	
+	10	2	VPP	83,33%	
-	2	95	VPN	97,94%	

VPP = Valor preditivo positivo; VPN = Valor preditivo negativo.

