

## Revisão: Produção de $\beta$ -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae\*

Gabrielli S. Santiago<sup>1+</sup>, Cássia C. da Motta<sup>2</sup>, Greiciane F. Bronzato<sup>3</sup>, Daniela Gonçalves<sup>4</sup>, Miliane M. Soares de Souza<sup>5</sup>, Irene da Silva Coelho<sup>6</sup>, Helena Neto Ferreira<sup>7</sup>, Shana de Mattos de Oliveira Coelho<sup>8</sup>

**ABSTRACT.** Santiago G.S., Motta C.C., Bronzato G.F., Gonçalves D., de Souza M.M.S., Coelho I.daS., Ferreira H.N. & Coelho S.deM.deO. [A Review: AmpC  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae.] Revisão: Produção de  $\beta$ -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(supl. 3):17-30, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR465, Km 7, Campus Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil. E-mail: gabriellissantiago@outlook.com

AmpC  $\beta$ -lactamases are relevant enzymes produced constitutively or induced by chromosomal or plasmid genes expressed by members of Enterobacteriaceae family and other Gram negative bacteria. Producers of this type of  $\beta$ -lactamase hydrolyze almost all  $\beta$ -lactam antibiotics including cephalosporins, cephamycins, penicillins and combinations with  $\beta$ -lactamase inhibitors, limiting therapeutic options to treat infections caused by these resistant bacteria. In addition some mutations can induce appearance of an extended-spectrum AmpC (ESAC) that is able to hydrolyze four generation cephalosporins and carbapenems, and that phenomenon already has been detected in cattle. Small differences in the amino acid sequence characterize families and types of AmpC, with CMY-2 prevalent in isolates from pet and food animals in world. Presence of AmpC is often associated with multidrug resistance due to the co-presence of other resistance genes in the same plasmid that confer resistance to the most varied classes of antimicrobials i.e aminoglycosides, quinolones, sulfonamides and tetracyclines. There are few antimicrobial agents safely effective against these isolates and many of them are not available or are not approved for animal use. Different detection methods are available, however the lack of international standardization limits the reporting of AmpC by clinical laboratories, which may underestimate this mechanism of resistance.

KEY WORDS. AmpC  $\beta$ -lactamase, Enterobacteriaceae, ESAC.

**RESUMO.**  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC são importantes enzimas produzidas de forma constitutiva ou induzida, através da expressão de genes cro-

mossomais ou plasmidiais, por membros da família Enterobacteriaceae e outras Gram negativas. Sua importância clínica reside no fato de que iso-

\* Recebido em 21 de julho de 2016.

Aceito para publicação em 17 de novembro de 2016.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, MSc. Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LabacVet), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. +Autora para correspondência, E-mail gabriellissantiago@outlook.com

<sup>2</sup> Médica-veterinária, MSc. LabacVet, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. E-mail ca.damotta@hotmail.com

<sup>3</sup> Bióloga, MSc. LabacVet, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. E-mail greicibronzato08@gmail.com

<sup>4</sup> Análises Clínicas, PhD. Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, 4050-31, Portugal. E-mail dfmgoncalves@hotmail.com

<sup>5</sup> Médica-veterinária, PhD. LabacVet, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. E-mail milianemss@gmail.com

<sup>6</sup> Engenheira-agrônoma, PhD. LabacVet, UFRRJ, BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. E-mail irenecs@yahoo.com

<sup>7</sup> Farmacêutica, PhD. Laboratório de Bacteriologia, FFUP, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, 4050-31, Portugal. E-mail hferr@ff.up.pt

<sup>8</sup> Bióloga, PhD. LabacVet, UFRRJ, BR 465, Km 7, Campus Seropédica, RJ 23890-000. E-mail shana\_mattos@hotmail.com

lados produtores deste tipo de  $\beta$ -lactamase hidrolisam a maioria dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas e as combinações com inibidores de  $\beta$ -lactamases (ESBL), limitando as opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por estas bactérias. Para agravar este cenário, as mutações que causam alterações nas sequências de aminoácidos, conseqüentemente modificam a estrutura enzimática, o que promove o surgimento de AmpC de espectro entendido (ESAC) que é capaz de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos, e que já foi detectada em rebanho bovino. Pequenas diferenças na sequência de aminoácidos deram origem às famílias e tipos de AmpC, sendo CMY-2 prevalente em isolados oriundos de animais de companhia e de produção em todos os continentes. Presença de AmpC está frequentemente associada à multirresistência, uma vez que genes de resistência às mais variadas classes de antimicrobianos, por exemplo aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina, além de genes codificadores de outras  $\beta$ -lactamases, podem estar presentes em um mesmo plasmídeo. O número de agentes antimicrobianos seguramente efetivos contra esses isolados é limitado e muitos deles não estão disponíveis ou não são aprovados para uso animal. Diferentes métodos de detecção estão disponíveis, no entanto a ausência de padronização internacional tem limitado a notificação de AmpC pelos laboratórios clínicos, o que pode subestimar este mecanismo de resistência.

**PALAVRAS-CHAVE.** AmpC  $\beta$ -lactamase, Enterobacteriaceae, ESAC.

## INTRODUÇÃO

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

$\beta$ -lactamases são enzimas que acarretam na resistência das bactérias aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Atualmente existem quatro classes de  $\beta$ -lactamases e mais de 1000 varie-

dades destas enzimas descritas em bactérias Gram negativas, dentre elas as mais comuns são da família TEM e SHV reportadas desde 1965 e CTX-M reportada mais recentemente (Barlow & Hall 2002, Dias 2009, Tolentino 2009, Gonçalves 2010, Marsik & Nambiar 2011).

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

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

O presente trabalho tem como objetivo demonstrar as características da enzima AmpC bem como sua importância epidemiológica e no contexto atual de multirresistência aos antimicrobianos expressas por enterobactérias.

## $\beta$ -Lactamase Tipo AmpC

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

AmpC é uma serina- $\beta$ -lactamase pertencente ao grupo 1 de Bush et. al. (1995; 2010) e à classe C de Ambler (1980). A classificação de  $\beta$ -lactamases mais usada é a proposta por Bush et. al. (1995; 2010) que utiliza a função enzimática para separar os grupos (Quadro 1). O Grupo 1 é composto por enzimas que hidrolisam cefamicinas (cefotaxima e cefotetan), oximino-cefalosporinas (como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona), e monobactâmicos

(como o aztreonam), mas em menor nível. AmpC é capaz de hidrolisar aminopenicilinas associadas com inibidores de ESBL ( $\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido; amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina com sulbactam) e não age sobre cefalosporinas de quarta geração (cefepime) nem carbapenemas (Nordmann & Mammari 2007, Jacoby 2009, Martínez-Rojas 2009). AmpC foi distinguida das demais serina- $\beta$ -lactamases porque apesar de também conter este aminoácido em seu sítio ativo, tem origem diferente das demais e por isso tem sido descrita como serina- $\beta$ -lactamase de classe C (Ambler 1980, Jaurin & Grunsdrom 1981).

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

Como dito anteriormente, as  $\beta$ -lactamases AmpC não são inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases nem de carbapenemase, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, tampouco por EDTA. Porém, cloxacilina e oxacilina, e também o ácido borônico e seus derivados conseguem inibir a ação hidrolítica das enzimas AmpC (Tabela 1) (Coudron 2005, Jacoby, 2009, Rodríguez-Martínez et al. 2009, Tondi et al. 2010, Su et al. 2012, Pires et al. 2015).

Muitas bactérias produzem naturalmente AmpC, sendo as pertencentes à família Enterobacteriaceae: *Buttiauxella agrestis*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter werkmanii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter* spp., *Erwinia rhapontici*, *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morgani*, *Proteus rettgeri*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. (Jacoby 2009). Estas bactérias possuem o gene cromossomal induzível e quando previamente ex-

Quadro 1. Classificação de  $\beta$ -lactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby (2010).

Grupo segundo Bush-Jacoby (2009)	Classe Molecular (subclasse)	Substrato	Ação de inibidores de ESBL	Características	Exemplo de enzimas
1	C	Cefalosporinas	Não	Melhor hidrólise de cefalosporinas do que de benzilpenicilinas; hidrolisa cefamicina.	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99, ACT-1, GCI, CMY-37
1 E	C	Cefalosporinas	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima frequentemente outras oxiiimino- $\beta$ -lactâmicos.	
2a	A	Penicilinas	Sim	Maior hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas.	PCI
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de menor espectro	Sim	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Sim	Hidrólise aumentada de oxiiimino- $\beta$ -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Não	Hidrólise aumentada de oxiiimino- $\beta$ -lactâmicos combinadas com a resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	Sim	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, cefepime	Sim	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepime e cefpiroma.	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oxiiimino- $\beta$ -lactâmicos.	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenemas.	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Hidrólise de cefalosporinas, inibida por ácido clavulânico mas não por aztreonam.	CepA
2f	A	Carbapenemas	Variável	Hidrólise aumentada de carbapenemas oxiiimino- $\beta$ -lactâmicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenemas	Não	Hidrólise de amplo-espectro incluindo carbapenemas mas não monobactâmicos.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B (B3) B (B2)	Carbapenemas	Não	Hidrólise preferencial de carbapenemas	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 CphA, Sfh-1

postas a agentes indutores – por exemplo: amplicilina, cefepime, ceftaxima, imipenem ou ácido clavulânico – expressam o gene e consequentemente apresentam características de produtor de AmpC como diminuída suscetibilidade à ceftaxima, resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases e suscetibilidade às cefalosporinas de quarta geração (Thomson 2001, Barlow & Hall 2002, Jacoby 2009).

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

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

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

Em 1989, Bauernfeind e colegas relataram a primeira cefamicinase mediada por plasmídeo em uma *Klebsiella pneumoniae* isolado na Coréia do Sul. Este isolado transferiu a resistência às cefamicinas (ceftaxima e ceftotetan) e também a penicilinas, oximinocefalosporinas e monobactam para *Escherichia coli*. Esta cefamicinase foi classificada pelo ponto isoelétrico (8,0), que sugeriu sua inclusão na classe C das  $\beta$ -lactamases, e foi denominada CMY-1 devido à sua atividade sobre as cefamicinas. Porém, a primeira prova de  $\beta$ -lactamase de classe C plasmidial foi fornecida por Papanicolaou et al. (1990). Estes pesquisadores demonstraram a transmissão da resistência a  $\alpha$ -metoxi e oximino- $\beta$ -lactâmicos mediada por uma enzima que denominaram MIR-1. Esta enzima apresentou propriedades bioquímicas de  $\beta$ -lactamase de classe 1 e a similaridade entre *mir-1* e *ampC* de *Enterobacter cloacae* era de 90%. Anterior a estes relatos, outros pesquisadores também observaram  $\beta$ -lactamase AmpC mediada por plasmídeo, mas com a perda do plasmídeo não foi possível aprofundar os estudos: em *Proteus mirabilis* (Bobrowski et al. 1976), em *Proteus* ou *Salmonella* spp. (Knothe et al. 1983).

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

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

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

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

& Hall 2002, Livermore & Woodford 2006, Nordmann & Mammeri 2007).

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

AmpC é a menos relatada dentre as  $\beta$ -lactamases, em especial em isolados oriundos de animais (Barlow & Hall 2002). Nos últimos anos houve aumento dos trabalhos envolvendo enterobactérias patogênicas em animais de companhia e de produção que sintetizam esta enzima, sendo a CMY-2 a prevalente em todos os continentes (Rayamajhi et al. 2008, Hordijk et al. 2013, Vingopoulow et al. 2014, Bogaerts et al. 2015, Lalak et al. 2016).

### Regulação de AmpC

A regulação de AmpC é estudada desde sua descoberta, por Jaurin & Grundstrom (1981) que

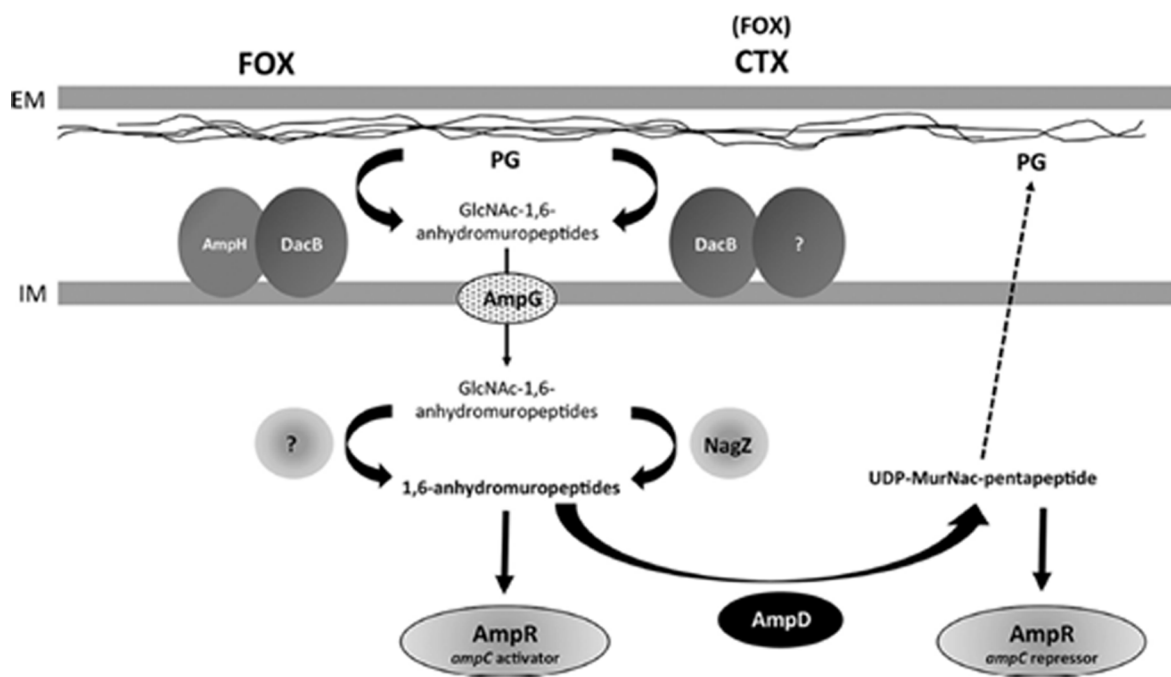


Figura 1. Modelo da indução transcricional de ampC pela exposição à cefoxitina ou cefotaxima, em *Enterobacter cloacae*. EM – membrana externa, IM – membrana interna, GlcNAC – N-acetilglicosamina, MurNac – ácido N-acetilmurâmico, PG – peptidoglicano, FOX – cefoxitina, CTX – cefotaxima, NagZ – codifica uma N-acetil-D-glucosaminidase. Ilustração e descrição de acordo com Guérin et al. (2015).

descreveram a região regulatória que precede a região codificante de *ampC*. A regulação da expressão de *ampC* pode diferir entre os microrganismos Gram negativos (Schmidtke & Hanson 2006). O mecanismo de expressão e repressão genética está associado à construção da parede celular e à possível exposição da bactéria a um  $\beta$ -lactâmico, e a regulação de *ampC* determina a diferença entre as  $\beta$ -lactamases AmpC constitutivas e induzíveis (Jacoby 2009, Martínez-Rojas 2009).

Cinco das mais de 20 AmpC mediadas por plasmídeo são induzíveis, DHA-1, DHA-2, ACT-1, CMY-13 pois estão ligadas ao gene *ampR*. Apesar de CFE-1 também estar ligado ao *ampR*, aparentemente não é induzível (Schemidtke & Hanson 2006, Jacoby 2009).

A indução de AmpC ocorre por meio de um sistema envolvendo AmpD (uma amidase citosólica), AmpG (uma permease da membrana interna), AmpR (um regulador transcricional tipo Lis-R) e intermediários de peptidoglicanos que são reciclados (Figura 1). O gene *ampC* de *Escherichia coli* é normalmente expresso em baixo nível, regulado por um mecanismo de atenuação dependente da taxa de crescimento, mas não por indução, uma vez que o regulador *ampR* foi perdido (Philippon et al. 2002, Schemidtke & Hanson 2006, Al-Bayssari et al. 2015).

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

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

Muitos estudos para compreensão do mecanismo de regulação de AmpC são realizados, em especial com *Pseudomonas aeruginosa*, e vem demonstrando a ligação de outros genes e de proteínas ligantes de penicilinas (PBP) no complexo sistema de reciclagem da parede celular bacteriana (Guérin et al. 2015). Em *Escherichia coli*, o gene *bolA* também está envolvido na regulação de *ampC* uma vez que *bolA* regula a morfologia e a composição da parede da célula desta espécie bacteriana durante a divisão celular (Santos et al. 1999, 2002).

### AmpC de espectro estendido (ESAC) - Um novo tipo de AmpC

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

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

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

Pires et. al. (2015) descreveram o primeiro caso clínico onde uma pAmpC, CMY-2, evoluiu para uma pESAC, CMY-33 durante tratamento com cefepime. A  $\beta$ -lactamase CMY-33 demonstrou fenótipo semelhante ao de uma ESBL, com alta CIM (Concentração Inibitória Mínima) para cefepime mas baixa CIM para cefoxitina e ampicilina quando comparada com CMY-2. Essa diferença pode ser explicada pela deleção de Leu293-Ala294 na hélice H-10 de CMY-33.

Novas ESAC podem surgir a partir de mutações variáveis na estrutura da enzima convencional, uma vez que ensaios laboratoriais já demonstraram

atividade de ESAC em enterobactérias modificadas "in vitro" (Nordmann & Mammeri 2007).

### Epidemiologia de enterobacteriaceae produtores de ampC em animais

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

No continente europeu é possível encontrar todos os tipos de AmpC circulando nos diferentes ambientes: hospitalar, comunidade, animais, carnes e água (Bret et al. 1998, Mata et al. 2012, Miró et al. 2013, Treviño et al. 2012, Wu et al. 2013, Amador et al. 2015). Na América do Sul, foram descritas CMY-2, DHA-1, ACT-1 e MIR-1 em *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (Pavez et al. 2008, Jones et al. 2009, Cejas et al. 2012, Egervärn et al. 2014, Botelho et al. 2015). Atualmente, mais de 30 pAmpC estão circulando entre as enterobactérias patogênicas, como pode ser constatado na tabela 2.

A enzima CMY é a mais importante do grupo LAT-BIL-CMY pela sua disseminação global, principalmente em *Escherichia coli*. As demais enzimas são pouco relatadas em Enterobacteriaceae. Dentre todos os genes plasmidiais, o mais relatado em

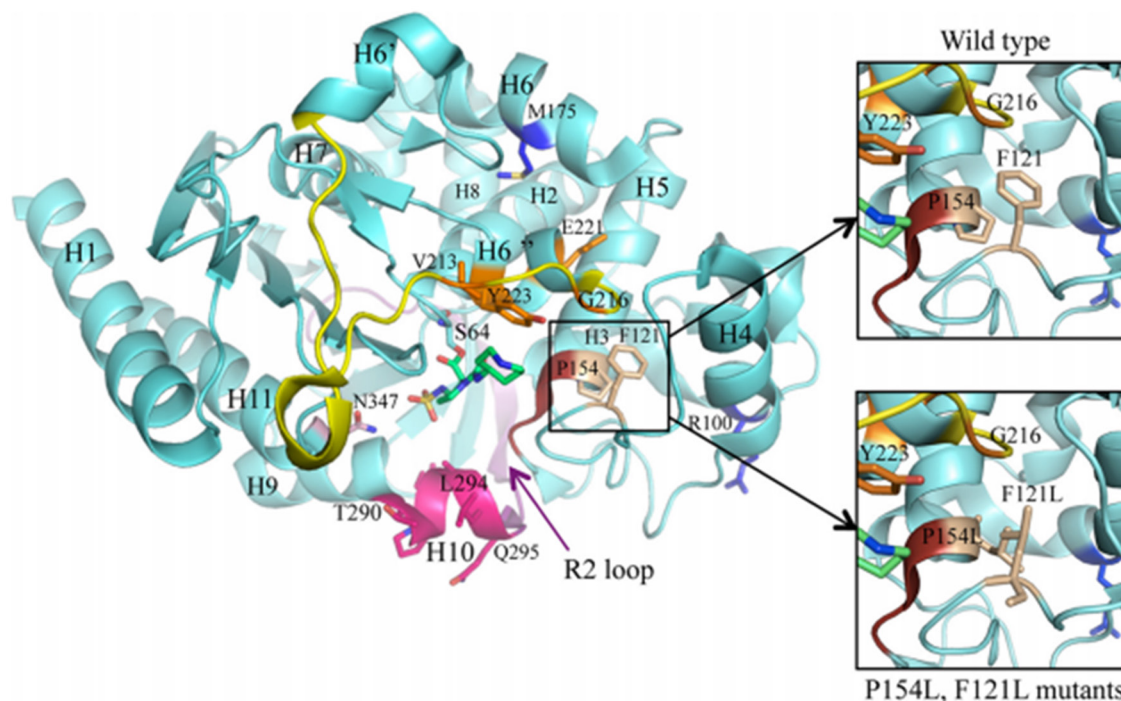


Figura 2. Representação da estrutura da enzima AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* – modelo de produtor natural de AmpC - ligada a um inibidor representado pela molécula em cor verde. As principais regiões possíveis de alterações na atividade enzimática estão representadas pelas cores como a seguir: giro ômega – amarelo; hélice H-10 – rosa; curva R2 – roxo; e YSN – laranja. Modificado de Berrazeg et al. (2015).

Tabela 2. Características da enzima AmpC, sua atividade enzimática e ação de inibidores

Tipo de AmpC	Hidrólise de Cefalosporina de 2ª Geração	Hidrólise de Cefalosporina de 4ª Geração	Ação de inibidores de ESBL <sup>b</sup>	Inibição por EDTA <sup>c</sup>	Inibição por CLOX <sup>d</sup> / AB <sup>e</sup>
AmpC cromossomal	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
AmpC plasmidial	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
ESAC <sup>a</sup>	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM

<sup>a</sup> ESAC: AmpC de Espectro Estendido - <sup>b</sup> ESBL: β-lactamase de Espectro Estendido - <sup>c</sup> EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético - <sup>d</sup> CLOX: cloxacilina - <sup>e</sup> AB: ácido borônico.

todo o mundo é o CMY descrito em isolados humanos, animais, produtos de origem animal e ambiente (Philippon et al. 2002). A CMY-2 é a prevalente, no entanto mutações ocasionaram a criação de novas CMY inclusive de espectro estendido (Bret et al. 1998, Haldorsen et al. 2008, Mata et al. 2012, Pires et al. 2015). CMY e DHA-1 são produzidas por *Klebsiella pneumoniae* e ambas as enzimas já foram descritas nestas espécies oriundas de animais, como suínos e cães (Rayamajhi et al. 2008, Bogaerts et al. 2015).

O maior número de relatos de enterobactérias produtoras de AmpC, após a origem humana, é em animais de produção e na carne proveniente destas espécies. No Brasil, há apenas relatos de enterobactérias produtoras de AmpC em carne de frango (Botelho et al. 2015).

Em animais domésticos, gatos e cães, já foram isolados *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* produtores de CMY, todos em países europeus (Hordijk et al. 2013, Vingopoulou et al. 2014, Bogaerts et al. 2015).

A disseminação destas cepas carreadoras de genes pAmpC ocorre por animais e humanos. Um fator de risco importante neste contexto é a importação de carnes não só pela disseminação de cepas resistentes à cefoxitina mas também a outros antimicrobianos (Reich et al. 2013, Voets et al. 2013, Wu et al. 2013). Outro fator relacionado à transmissão de cepas resistentes é o íntimo contato do homem com os animais. Um isolado produtor de CMY-2 foi identificado em uma criança de 12 anos, filha de um fazendeiro proprietário de um rebanho infectado pela mesma cepa, e a mesma enzima foi detectada em enterobactérias isoladas de frango de corte e manipuladores de uma granja, na Holanda (Jacoby 2009, Dierikx et al. 2013).

### Quimioterapia antimicrobiana para infecções causadas por enterobacteriaceae produtores de ampC

Em 1986, observou-se a emergência de enterobactérias resistentes em infecções causadas por estas bactérias devido ao uso de cefalosporinas de terceira geração (Honoré et al. 1986). Com a evolução dos mecanismos de resistência, as terapias

antimicrobianas precisaram ser modificadas ou ajustadas, e no caso de enterobactérias produtoras de AmpC isso deveu-se às mudanças estruturais desta enzima como o aumento de seu espectro de ação (ESAC) (Nordmann & Mammeri 2007). Atualmente, deparamos com o complexo quadro de multirresistência antimicrobiana pelas mais diversas espécies bacterianas apesar da notícia declarada em 1969, por um órgão estadunidense, de que a problemática sobre as doenças infecciosas estaria resolvida após o advento dos antibióticos (Rasko & Sperandio 2010).

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

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

Segundo Jacoby (2009), amdinocilina e temocilina (derivado da 6-α-metoxi-ticarclina) tem tido bons resultados *in vitro* e este composto pode ser utilizado em infecções causadas por bactérias produtoras de AmpC cromossomal e plasmidial. Em isolados produtores de AmpC pode-se fazer uso de carbapenemas e fluoroquinolonas, mas esta escolha



deve ser baseada em avaliação de suscetibilidade do isolado a estes agentes. A piperacilina e ticarcilina são recomendadas em casos de enterobactérias produtoras de ESAC porém pode ocorrer falha terapêutica quando se tratar de cepas super produtoras de AmpC (Nordmann & Mammeri 2007).

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

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

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

A terapia antivirulência pode ser uma opção visto que algumas moléculas podem ser utilizadas como inibidores de *quorum sense*, de adesinas, da ligação da toxina ao receptor hospedeiro, de sistemas secretórios e até mesmo da expressão gênica de fatores de virulência (Rasko & Sperandio 2010, Schuster et al. 2013). A segurança dessas novas terapias ainda precisa ser bem estudada para evitar interação com a microbiota do indivíduo, além de que deve ser mantido um controle e vigilância sobre o uso desses agentes a fim de evitar pressão

sobre as bactérias levando ao desenvolvimento de novos mecanismos de virulência (Clatworthy et al. 2007, Rasko & Sperandio 2010, Schuster et al. 2013). O uso concomitante de antimicrobianos e drogas antivirulência também podem ser feito, assegurando uma melhor eficácia do tratamento (Clatworthy et al. 2007, Schuster et al. 2013).

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

### Métodos de detecção de ampC

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

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

A suscetibilidade do isolado às cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) é o teste de triagem para suspeita da produção de  $\beta$ -lactamase tipo AmpC e a observação da resistência do isolado aos inibidores de  $\beta$ -lactamase também é um importante dado (Thomson 2001). Técnicas de avaliação do sinergismo entre o substrato e um inibidor seletivo em diluição em caldo, difusão em ágar ou sistemas comerciais são outras metodologias utilizadas. O sistema mais confiável para detectar a habilidade de produção de AmpC é a amplificação do gene por PCR, porém este método não está disponível em todos os laboratórios clínicos de rotina, difi-

cultando a notificação de isolados potencialmente produtores da enzima (Nordmann & Mammeri 2007, Marsik & Nambiar 2011). O PCR multiplex também vem sendo usado para detectar vários genes que codificam resistência a antimicrobianos ao mesmo tempo (Pérez-Pérez & Hanson 2002, Dalenne et al. 2010).

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

A detecção da enzima pode ser feita através da técnica de extração enzimática tridimensional e vem sendo utilizada há muitos anos para confirmação deste mecanismo de resistência, embora também não seja reconhecida pelos manuais internacionais de padronização de técnicas laboratoriais (Sobia et al. 2011). Esta técnica foi comparada a um meio específico para detecção de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de AmpC: o ágar cefoxitina (CAM - cefoxitin-agar medium). Este método, proposto por Nasim et al. (2004), é realizado adicionando cefoxitina em diferentes concentrações ao ágar Müller Hinton onde é estriada a cepa padrão *E. coli* ATCC25922 e os extratos dos isolados são inoculados nas placas para avaliação da inativação do antimicrobiano pelo extrato e consequente crescimento da cepa padrão. Um terceiro método utilizando extrato enzimático é a focagem isoeletrica a qual é possível identificar as enzimas presentes pelo seu ponto isoeletrico (pI) (Bauernfeind et al. 1996, Power et al. 2006, Kim & Wei 2007, Haldorsen et al. 2008, Rodríguez et al. 2009).

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

Seguindo a mesma idéia de análise do teste de Hodge modificado para detecção de carbapenemase, descrito pelo CLSI, Yong et al. (2002) substituíram o disco de imipenem pelo disco de cefoxitina

- o marcador de produção de AmpC. Esta técnica foi descrita para detectar a produção de CMY-1 devendo ser ajustada para detecção de outras AmpC.

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

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

Segundo Thomson (2001), é possível diferenciar a produção de AmpC da perda de porinas pelo teste enzimático tridimensional, o qual é utilizado o extrato contendo as enzimas produzidas pelo isolado. Black et al. (2005) também descrevem uma técnica utilizando um disco de EDTA com o intuito de liberar as enzimas do espaço periplasmático pelo aumento de permeabilidade. Este disco próximo ao disco de cefoxitina serve para confirmação da produção de AmpC e descarta a perda de porinas. As cepas suspeitas de produzirem ESAC devem ser confirmadas para esta enzima, excluindo-se a possibilidade de produção de outras  $\beta$ -lactamases e também associação deste mecanismo de resistência à diminuição de porinas de membrana (Nordmann & Mammeri 2007).

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

## CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos mecanismos de resistência vem preocupando os órgãos de saúde pública, visto a dificuldade enfrentada atualmente no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares, e, principalmente pela transmissão de patógenos multirresistentes através da cadeia alimentar.

No caso da enzima AmpC, os diversos estudos demonstraram a transferência do gene cromosso-

mal, natural de algumas espécies de enterobactérias, para um elemento móvel e sua disseminação dentre as diferentes espécies de Gram negativos, pelo mundo. Além disso, as mutações nesse gene demonstram sua atividade antimicrobiana estendida ocasionando em falhas terapêuticas e na dificuldade de tratamento de infecções causadas por estas cepas.

Como solução, terapias utilizando como alvo os fatores de virulência da espécie causadora da infecção devem ser estudadas já que há relatos de Enterobacteriaceae produtoras de AmpC resistentes à colistina que seria o último antimicrobiano de eleição.

A detecção da enzima AmpC é dificultada devido às técnicas implementadas em cada grupo de pesquisa, já que não há padronização de testes para confirmar este mecanismo de resistência. Além disso, as características das AmpC cromossomais e plasmidiais complicam a diferenciação dentre as diversas enzimas já descritas. Métodos rápidos e eficazes devem ser desenvolvidos para a detecção de AmpC, independente de ser cromossomal ou plasmidial.

**Agradecimentos.** Aos colaboradores do LabacVet (UFRRJ) e Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Farmácia (UP), e à CAPES pela concessão da bolsa doutorado sanduíche, PDSE 99999.008079/2014-05.

## REFERÊNCIAS

- Abraham E.P. & Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146:837, 1940.
- Al-Bayssari C., Daboussi F., Hamze M. & Rolain J.M. Detection of expanded-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13:1139-58, 2015.
- Amador P.P., Fernandes R.M., Prudêncio M.C., Barreto M.P. & Duarte I.M. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of Class A and Class C  $\beta$ -lactamses. *Journal of Environmental Science and Health*, 50:26-39, 2015.
- Ambler R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*, 289:321-331, 1980.
- Barnaud G., Labia R., Raskine L., Pors M.J.S., Philippon A. & Arlet G. Extension of resistance to cefepime and cefpirome associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 195:185-190, 2001.
- Barlow M. & Hall B.G. Origin and evolution of the AmpC  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1190-1198, 2002.
- Bauernfeind A., Chong Y. & Schweighart S. Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 17:316-321, 1989.
- Bauernfeind A., Stemplinger I., Jungwirth T., Ernst S. & Casellas J. M. Sequences of  $\beta$ -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40:509-513, 1996.
- Berrazeg M., Jeannot K., Ntsogo Enguéné V.Y., Broutin I., Loeffert S., Fournier D. & Plésiat P. Mutations in  $\beta$ -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:6248-6255, 2015.
- Black J. A., Moland E. S. & Thomson K. S. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* 43:3110-3113, 2005.
- Bobrowski M., Matthew G., Barth P. T., Datta N., Grinter N. J., Jacob A.E., Kontomichalou P., Dale J.W. & Smith J.T. Plasmid-Determined  $\beta$ -Lactamase Indistinguishable from the Chromosomal  $\beta$ -Lactamase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 125:149-157, 1976.
- Bogaerts P., Huang T.-D., Bouchahrouf W., Baurang C., Berhin C., Garch F.E., Glupczynski Y. & Compath Study Group. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. *Microbial Drug Resistance*, 21:643-50, 2015.
- Börjesson S., Egerväm M., Lindblad M. & Englund S. High occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and transferable AmpC  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. *Applied Environmental Microbiology*, 79: 2463-2466, 2013.
- Botelho L.A.B., Kraychete G.B., Costa e Silva J.L., Regis D.V.V., Picão R.C., Moreira B.M. & Bonelli R.R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 249-254, 2015.
- Bret L., Chanal-Claris C., Sirot D., Chaibi E. B., Labia R. & Sirot J. Chromosomally Encoded AmpC-Type  $\beta$ -Lactamase in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:1110-1114, 1998.
- Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1211-1233, 1995.
- Bush K. & Jacoby G.A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:969-976, 2010.
- Caroff N., Espaze E., Gautreau D., Richet H. & Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45:783-788, 2000.
- Cejas D., Canifia L. F., Quinteros, M., Giovanakis M., Vay C., Lasciandare S., Mutti D., Pagniez G., Almuzara M., Gutkind G. & Radice M. Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Revista Argentina de Microbiología*, 44: 182-186, 2012.
- Clatworthy A. E., Pierson E. & Hung D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3:541-8, 2007.
- Coudron P.E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:4163-4167, 2005.
- Dallenne C., Costa A., Decre D., Favier C. & Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:490-495, 2010.
- D'Andrea M.M., Nucleo E., Luzzaro F., Giani T., Migliavacca R., Vailati F., Kroumova V., Pagani L. & Rossolini G. M. CMY-16, a Novel Acquired AmpC-Type  $\beta$ -Lactamase of the CMY/LAT Lineage in Multifocal Monophyletic Isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:618-624, 2006.
- Dias, D. J. A. *Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo*. Dissertação (Genética Molecular e Biomedicina). Universidade Nova de Lisboa. 2009.
- Dierikx C., Mevius D., Wagenaar J.A. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology*, 4:242, 2013.
- Egervärn M., Börjesson S., Byfords S., Finn M., Kaipe C, Englund S.,

- Lindblad M. *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or transferable AmpC  $\beta$ -lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 171:8-14, 2014.
- Fernandes M.R., McCulloch J.A., Vianello M.A., Moura Q., Pérez-Chaparro P.J., Esposito F., Sartori L., Dropa M., Matté M.H., Lira D.P.A., Mamizuka E.M. & Lincopan N. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a Human Infection in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60:6415-6417, 2016.
- Fleming A. On the antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10:226-236, 1929.
- García-Cobos S., Kock R., Mellmann A., Frenzel J., Friedrich A.W. & Rossen J.W.A. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended-Spectrum and AmpC  $\beta$ -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. *PLoS One*, 10:e0134533, 2015.
- Gaspar G. G., Bellissimo-Rodrigues F., Andrade L. N., Darini A. L. & Martinez R. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48:483-487, 2015.
- Gonçalves, T. M. P. *Caracterização de genes que codificam beta-lactamases de espectro alargado em Enterobacteriaceae de origem hospitalar*. Monografia (Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. 2010.
- Guérin F., Isnard C., Cattoir V. & Glard J.C. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:7753-7761, 2015.
- Haenni M., Châtre P. & Madec J. Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC  $\beta$ -lactamases (ESAC) in animals. *Front Microbiology*, 5:53, 2014.
- Haldorsen B., Aasnaes B., Dahl K.H., Hanssen A.M., Simonsen G.S., Walsh T.R., Sundsfjord A. & Lundblad E.W. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:694-702, 2008.
- Homma T., Nuxoll A., Gandt A.B., Ebner P., Engels I., Schneider T., Götz F., Lewis K. & Conlon B.P. Dual Targeting of Cell Wall Precursors by Teixobactin Leads to Cell Lysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60:6510-6517, 2016.
- Honoré N., Nicolas M. H. & Cole S. T. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 5:3709-3714, 1986.
- Hordijk J., Schoormans A., Kwakemaak M., Duim B., Broens E., Dierikx C., Mevius D. & Wagenaar J.A. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing **Enterobacteriaceae** in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology*, 4:242, 2013.
- Hujer A.M., Page M.G.P., Helfand M.S., Yeiser B. & Bonomo R.A. Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting and Quantifying CM-2 and SHV- $\beta$ -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:1947-1957, 2002.
- Jacoby, G.A. & Tran, J. Sequence of the MIR-1  $\beta$ -Lactamase Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1759-1760, 1999.
- Jacoby, G.A. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:161-182, 2009.
- Jaurin, B. & Grundstrom, T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from tha of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 78:4897-49901, 1981.
- Jiang X., Zhang Z., Li M., Zhou D., Ruan F. & Lu Y. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:2990-2995, 2006.
- Jones-Dias D., Manageiro V., Ferreira E. & Louro D. Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP) Participants & Caniça M. Diversity of Extended-Spectrum and Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Portuguese Health Care Facilities. *Journal of Microbiology*, 52:496-503, 2014.
- Jones C. H., Tuckman M., Keeney D., Ruzin A. & Bradford P.A. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:465-475, 2009.
- Kim S.-H. & Wei C. -I. Expression of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter cloacae* isolated from retail ground beef, cattle farm and processing facilities. *Journal of Applied Microbiology*, 103:400-408, 2007.
- Kim J.Y., Jung H.I., An Y.H. Lee J.H, Kim S.J., Jeong S.H., Lee K.J, Suh P.-H., Lee H.-S., Lee S.H. & Cha S.-S. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C  $\beta$ -lactamase. *Molecular Microbiology*, 60:907-916, 2006.
- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M. & Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11:315-7, 1983.
- Lalak A., Wasyl D., Zajac M., Skarzynska M., Hoszowski A., Samcik I., Wozniakowski G. & Szulowski K. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Veterinary Microbiology*, pii:S0378-113530023-2, 2016.
- Ling L.L, Schneider T., Peoples A.J., Spoeing A.L., Engels I., Conlon B.P, Mueller A., Schäberle T.F, Hughes D.E., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V.A., Cohen D.R., Felix C.R., Fetterman K.A., Millett W.P., Nitti A.G., Zullo A.M., Chen C. & Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517:455- 359, 2015.
- Livermore D.M. & Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14:413-419, 2006.
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.-F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.-H. & Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious Diseases*, 16:161-8, 2015.
- Loncaric I., Stalder G.L., Mehinagic K., Rosengarten R., Hoelzl F., Knauer F. & Walzer, C. Comparison of ESBL - And AmpC Producing Enterobacteriaceae and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Migratory and Resident Population of Rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLoS ONE*, 8: e84048, 2013.
- Mammeri H., Poirel L., Fortineau N. & Nordmann P. Naturally Occurring Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:2573-2576, 2006.
- Mammeri H., Nazic H., Naas T., Poirel L., Léotard S. & Nordmann P. AmpC  $\beta$ -Lactamase in an *Escherichia coli* Clinical Isolate Confers Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:4050-4053, 2004.
- Manoharan A., Sugumar M., Kumar A., Jose H., Mathai D. & ICMR-ESBL Study Group. Phenotypic & molecular characterization of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. & *Enterobacter* spp. from five Indian Medical Centers. *Indian Journal of Medical Research*, 135:359-364, 2012.
- Marsik F.J. & Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC- $\beta$ -lactamases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30:1094-1095, 2011.
- Martínez-Rojas D.D.D.  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:78-83, 2009.
- Mata C., Miró E., Alvarado A., Garcillán-Barcia M. P., Tolema N M., Walsh T. R., Cruz F. & Navarro F. Plasmid typing and genetic context of AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking induc-

- ible chromosomal *ampC* genes: findings from a Spanish hospital 1999–2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 115–122, 2012.
- McCann P., Snesrud E., Maybank R., Corey B., Ong A.C., Clifford R., Hinkle M., Whitman T., Lesho E. & Schaechers K.E. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of 2 *mcr-1* in the USA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60:4420-1, 2016.
- Miró E., Aguero J., Larrosa M.N., Fernández A., Conejo M.C., Bou G., González-López J.J., Lara N., Martínez-Martínez L., Oliver A., Aracil B., Oteo J., Pascual A., Rodríguez-Baño J., Zamorano L. & Navarro F. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32:253-9, 2013.
- Nguyen D.P., Nguyen T.A.D., Le T.H., Tran N.M.D., Ngo T.P., Dang V.C., Kawai T., Kanki M., Kawahara R., Jinnai M., Yonogi S., Hirai Y., Yamamoto Y. & Kumeda Y. Dissemination of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. *BioMed Research International*, 2016 : 9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8182096>>.2016>.
- Nasim K., Elsayed S., Pitout J.D.D., Conly J., Church D.L., Gregson D.B. New Method for Laboratory Detection of AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:4799-4802, 2004.
- Nordmann P. & Mammari H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiology*, 2:297-307, 2007.
- Nukaga M., Haruta S., Tanimoto K., Kogure K., Taniguchi K., Tamaki M. & Sawai T. Molecular Evolution of a Class C  $\beta$ -Lactamase Extending Its Substrate Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:5729-5735, 1995.
- Olsson O., Bergstrom S., Lindberg F. P. & Normark S. AmpC  $\beta$ -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: Natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 80:7556-7560, 1983.
- Papagiannitsis C.C., Kotsakis S.D., Gniadkowski T.M., Miriagou V. & Hrabak J. Identification of CMY-2-Type Cephalosporinases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58:2952-2957, 2014.
- Papanicolaou G.A., Medeiros A.A. & Jacoby G.A. Novel Plasmid-Mediated 1-Lactamase (MIR-1) Conferring Resistance to Oxymino- and  $\alpha$ -Methoxy 1-Lactams in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34:2200-2209, 1990.
- Parmar A., Iyer A., Vincent C. S., Lysebetten D. V., Prior, S. H., Madder A., Taylor E. J. & Singh I. Efficient total syntheses and biological activities of two teixobactin analogues. *Chemistry Communications*, 52: 6060-6063, 2016.
- Pavez M., Neves P., Dropa M., Matté M. H., Grinbaum R. S., Elmor de Araújo M. R., Mamizuka E. M. & Lincopan N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 57:1590-2, 2008.
- Pérez-Pérez F.J. & Hanson N.F. Detection of Plasmid-Mediated AmpC-  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:2153-2162, 2002.
- Peter-Getzlaff S., Pölsfuss S., Poledica M., Hombach M., Giger J., Böttger E. C., Zbinden R. & Bloemberg G.V. Detection of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:2924-2932, 2011.
- Philippon A., Arlet G. & Jacoby G.A. Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1-11, 2002.
- Pires J., Taracila M., Bethel C. R., Doi Y., Kasraian S., Tinguely R., Sendi P., Bonomo R. A. & Endimiani A. In vivo Evolution of CMY-2 to CMY-33  $\beta$ -Lactamase in *Escherichia coli* ST131: Characterization of an Acquired Extended-Spectrum AmpC (ESAC) Conferring Resistance to Cefepime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:7483-7488, 2015.
- Pölsfuss S., Bloemberg G.V., Giger J., Meyer V., Böttger E.C. & Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:2798-2803, 2011.
- Power P., Galleni M., Ayala J.A. & Gutkind G. Biochemical and Molecular Characterization of Three New Variants of AmpC  $\beta$ -Lactamases from *Morganella morganii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:962-967, 2006.
- Rayamajhi N., Kanf S. G., Lee D. Y., Kang M.L., Lee S. I., Park K. Y., Lee H. S. & Yoo H. S. Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type  $\beta$ -lactamases from cephalosporin resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. *International Journal of Food Microbiology*, 124:183-187, 2008.
- Rasko D.A. & Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9:117-128, 2010.
- Reich F., Atanassova V. & Klein G. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 19: 1253–1259, 2013.
- Rodríguez I., Barownick W., Helmuth R., Mendoza C., Rodicio M. R., Schroeter A. & Guerra B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:301–309, 2009.
- Rodríguez-Martínez J.M., Fernández-Echauri P., Fernández-Cuenca F., Alba P. D., Briales A. & Pascual A. Genetic characterization of an extended-spectrum AmpC cephalosporinase with hydrolysing activity against fourth-generation cephalosporins in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* selected in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:64–68, 2012.
- Rodríguez-Martínez J.M., Poirel L. & Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:1766-1771, 2009.
- Ruppé E., Bidet P., Verdet C., Arlet G. & Bingen E. First Detection of the Ambler Class C 1 AmpC  $\beta$ -Lactamase in *Citrobacter freundii* by a New, Simple Double-Disk Synergy Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:4204–4207, 2006.
- Santos J. M., Freire P., Vicente M. & Arraiano C. M. The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Molecular Microbiology*, 32:789-798, 1999.
- Santos J.M., Lobo M., Matos A.P.A., Pedro M.A. & Arraiano C. M. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 45:1729-1740, 2002.
- Schmidtke A.J. & Hanson N.D. Model System to Evaluate the Effect of *ampD* Mutations on AmpC-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:2030-2037, 2006.
- Schuster M., Sexton D.J., Diggle S.P. & Greenberg E.P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*, 67:43-63, 2013.
- Shahid M., Malik A., Agrawal M. & Singhal S. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54:684–687, 2004.
- Sobia F., Shahid M., Singh A., Khan H.M., Shukla I. & Malik A. Occurrence of *bla* in cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from a North Indian tertiary care hospital. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, 65:5-9, 2011.
- Sohn S.G., Lee J.J., Sohn E.S., Kang L-W & Lee S. H. Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC  $\beta$ -lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61:965-970, 2008.
- Su W.Y., Gottlieb T. & Merlino J. Optimal phenotypic testing of AmpC  $\beta$ -lactamases using boronic acid solutions. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31:49–51, 2012.

- Suzuki S., Ohnishi M., Kawanishi M., Akiba M. & Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infectious Diseases*, 16:284-5, 2016.
- Thomson K.S. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Emerging Infectious Diseases*, 7:333-336, 2001.
- Tolentino, F. M. *Deteção e identificação dos genes de beta-lactamases blaSHV, blaTEM E blaCTX-M em Klebsiella pneumoniae isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo*. Dissertação (Microbiologia). Universidade Estadual Paulista. 2009.
- Tondi D., Caló S., Shoichet B.K., Costi M.P. Structural study of phenyl boronic acid derivatives as AmpC  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3416-3419, 2010.
- Treviño M., Navarro, D., Barbeito, G., Areses, P., García-Riestra, C. & Regueiro, B. J. *Proteus mirabilis* productor de AmpC plasmídica en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela: prevalencia y caracterización molecular por rep-PCR y MALDI-TOF MS. *Revista Española de Quimioterapia*, 25:122-128, 2012.
- Vingopoulou E.I., Siarkou V.I., Batzias G. Kaltsogianni F., Sianou E., Tzavaras I., Koutinas A., Saridomichelakis M.N., Sofianou D., Tzelepi E. & Miriagou V. Emergence and maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* of canine origin harbouring a blaCMY-2-IncH1/ST65 plasmid and topoisomerase mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69:2076-2080, 2014.
- Voets G.M., Fluit A.C., Scharringa J., Schapendonk C., van denMunckhof T., Leverstein-van Hall M.A. & Stuart J.C. Identical plasmid AmpC  $\beta$ -lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 359-362, 2013.
- Wu G., Michaela J.D., Mafura M.T., Nunez-Garcia J., Fenner J.J., Sharma M., van Essen-Zandbergen A., Rodriguez I., Dierikx C., Kadlec K., Schink A.-K., Helmuth R., Guerra B., Schwarz S., Threlfall J., Woodward M.J., Woodford N., Coldham N. & Mevius D. Comparative Analysis of ESBL-Positive *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany. *PLoS ONE*, 8: e75392. doi:10.1371/journal.pone.0075392, 2013.
- Yang W., Gao X. & Wang B. Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(3): 346-368, 2003.
- Yong D., Park R., Yum J.H., Lee K., Choi E.C. & Chong Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC  $\beta$ -lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiological Methods*, 51:407- 410, 2002.
- Yusuf I., Qabli S.M., Balarabe A.L., Kabir A., Kabir M.R., Olivia E.S. & Abbas R. Detection of colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* co-producing extended spectrum, AmpC  $\beta$ -lactamase and carbapenemase in a tertiary hospital in Nigeria. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(Suppl 1):P129, 2015.
- Zeng X. & Lin J.  $\beta$ -lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4:128, 2013.