

JÉSSICA BRITTO GONÇALVES

CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE AmpC
PLASMIDIAL ISOLADAS DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL
COMUNITÁRIA



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/ 2023

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Profa. Dra. Renata Cristina Picão e coorientação do Me. Gabriel Taddeucci Rocha

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

B862c Britto Gonçalves, Jéssica
Caracterização de enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial isoladas de colonização intestinal comunitária / Jéssica Britto Gonçalves. -- Rio de Janeiro, 2023.
67 f.

Orientadora: Renata Cristina Picão.
Coorientador: Gabriel Taddeucci Rocha.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Ampc plasmidial. 2. betalactamases. 3. colonização comunitária. 4. enterobactérias. 5. resistência aos antimicrobianos. I. Cristina Picão, Renata, orient. II. Taddeucci Rocha, Gabriel, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Jéssica Britto Gonçalves**
 DRE: 120041221

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Raquel Regina Bonelli (Presidente)
 Profa. Marcia Garnica
 Dr. Wellington Felipe da Costa
 Profa. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

Título da Monografia: **“Caracterização de enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial isoladas de colonização intestinal comunitária”**

Local: **Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **28 de novembro de 2023 às 09:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2023.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora

Prof. Raquel Regina Bonelli

Prof. Raquel Regina Bonelli

Prof. Marcia Garnica

Prof. Marcia Garnica

Dr. Wellington Felipe da Costa

Dr. Wellington Felipe da Costa

Prof. Karla Rodrigues Miranda

Prof. Karla Rodrigues Miranda

Aluno:

Jéssica Britto Gonçalves

Jéssica Britto Gonçalves

Orientador:

Prof. Renata Cristina Picão / Coorientador Gabriel Taddeucci Rocha

Prof. Renata Cristina Picão / Coorientador Gabriel Taddeucci Rocha

Coordenador
de TCC

Prof. Marinella Silva Laport

Prof. Marinella Silva Laport

Documento assinado digitalmente

MARCIA GARNICA MAIOLINO

Data: 12/12/2023 17:45:16-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dedico esse trabalho aos que me fizeram ser quem eu sou hoje: Anna Paula, Gerson, Adriano, dona Leda e seu Paulo. Para sempre os amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido viver tudo isso e ter chegado até aqui, sempre me dando forças para que eu pudesse seguir em frente e não desistisse. Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Anna Paula, meu pai Gerson e o meu irmão Adriano, por estarem sempre do meu lado me apoiando, me incentivando e por acreditarem em mim. Obrigada por serem meus parceiros, por serem a minha base, e por me fazerem rir e me distrair nos momentos que eu mais precisava. Sou muito grata por vocês terem me permitido viver o 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia, me incentivando o tempo todo a submeter o meu resumo e me dando todo o apoio necessário para que, ao final da minha graduação, eu pudesse ter uma experiência incrível e enriquecedora como essa. Obrigada por me ajudarem a tirar uma grande pressão que eu coloco sobre mim mesma, me fazendo acreditar no meu potencial e me dando os melhores conselhos, a minha força vem de vocês. Eu amo muito cada um de vocês, obrigada por cuidarem de mim.

Agradeço também ao meu namorado André Felipe, que esteve comigo durante a minha graduação, sempre me apoiando, acreditando em mim mesmo quando eu não acreditava, e me incentivando. Muito obrigada por comemorar cada conquista comigo e me mostrar que todas elas merecem ser comemoradas, obrigada por ter ficado ao meu lado o tempo todo, me dando sempre os melhores abraços e beijos do mundo, eu te amo demais. Agradeço a minha madrinha Thereza e meu padrinho Fábio pelo carinho que vocês sempre têm por mim. Agradeço aos meus avós Paulo e Getúlio e as minhas avós Neuza e Leda por terem sido os melhores avós que eu poderia ter na vida. Obrigada por acompanharem o meu crescimento e por estarem sempre do meu lado me fazendo rir, me divertir, e me fazendo feliz ao lado de vocês. Sou eternamente grata por ter tido avós como vocês, e sei que juntos comemoraram cada conquista comigo e agora estão em festa no céu por eu ter conseguido realizar o meu sonho de ter me formado em uma das melhores universidades federais do Brasil, e em um curso que me apaixonei. Eu amo vocês e vou sempre levar vocês no meu coração.

Agradeço ao L IMM, o laboratório que me acolheu e que me ensinou muito durante a minha trajetória. Em especial, agradeço a Renata e Gabriel por terem me recebido de braços abertos mesmo quando eu não sabia nada, por terem me ensinado tudo do zero, sempre me aconselhando, me orientando da melhor forma possível, e me fazendo acreditar e confiar no meu bom trabalho. Sem vocês eu não seria a Jéssica que sou hoje. Sou extremamente grata

por terem me ajudado, me aconselhado, e por terem tido paciência comigo, espero um dia poder retribuir e orgulhar vocês. Obrigada Victória e Sarah por terem sido as melhores companheiras de bancada que eu poderia ter. Obrigada por também me receberem bem e compartilharem do conhecimento e experiência de vocês comigo. Obrigada pelas brincadeiras, risadas e momentos de descontração, vocês tornaram os dias mais leves, e se tornaram amigas especiais. Amo vocês.

Sou também muito grata a minha grande universidade, a universidade dos meus sonhos. Obrigada UFRJ por me proporcionar viver esse sonho, viver momentos incríveis, e por colocar na minha vida os meus grandes amigos: Luiza, Matheus, Pedro, Stella, Virgínia e Vitória. Estar com vocês durante esses quatro anos foi muito importante pra mim. Passamos por uma pandemia juntos, por diversas disciplinas, provas e trabalhos que sem vocês isso teria sido muito mais difícil. Obrigada por me proporcionarem ótimas risadas, conselhos, e tornarem a minha trajetória mais leve, feliz e divertida. Tenho muito orgulho de quem nos tornamos, do quanto crescemos e evoluímos. É muito bonito ver hoje cada um em uma área diferente, porém felizes e realizados, sempre torcendo uns pelos outros. Gostaria de agradecer as meninas que também foram importantes na minha trajetória final da graduação: Ana Júlia, Brenda, Camilla e Júlia. Obrigada por terem feito esse último ano divertido, TC I e II não teria sido a mesma coisa sem vocês. O CABJ me proporcionou ótimas risadas e nessa reta final, ter vocês compartilhando as terças e quintas comigo foi essencial. Obrigada por, mesmo distante, estarmos sempre apoiando e uma torcendo pela outra, vocês tem um lugar especial no meu coração.

Agradeço a todos os professores do instituto de Microbiologia Paulo de Góes por terem compartilhado comigo do seu conhecimento e terem contribuído para minha formação. Agradeço a minha banca avaliadora Márcia, Raquel e Wellington por auxiliarem nesse trabalho compartilhando de todo o conhecimento que possuem, o tornando mais rico. Agradeço a CNPq, agência de fomento que apoiou o meu trabalho e fez com que ele se tornasse possível.

Agradeço por fim a todos aqueles que fizeram o 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia uma semana especial. Ao final da minha graduação, esse evento pode enriquecer a minha vida acadêmica e profissional, e estar ao lado de vocês durante esses dias tornou esse evento ainda mais especial. Obrigada pelo companheirismo durante esses dias e por torcerem por mim ao final da minha graduação. O apoio de vocês foi muito importante.

RESUMO

Jéssica Britto Gonçalves

Caracterização de enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial isoladas de colonização intestinal comunitária

Orientadora: Renata Cristina Picão

Coorientador: Gabriel Taddeucci Rocha

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As enzimas betalactamases são importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente quando se trata de bactérias gram-negativas, as quais são capazes de colonizar o trato gastrointestinal e causar infecções. Bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem adquirir e expressar betalactamases com diferentes estruturas e espectros de substratos e, dentre elas, as cefalosporinases do tipo AmpC que são mediadas por plasmídeos (pAmpC). Esse grupo de enzimas tem a capacidade de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração, monobactâmicos e cefamicinas, além de não serem inibidas por inibidores de betalactamases clássicos, como o ácido clavulânico. Ademais, sabe-se que a resistência é um dos maiores desafios para a saúde no cenário atual, uma vez que ela não se limita ao ambiente hospitalar. Tanto os genes que codificam os atributos de resistência, quanto as bactérias que os carregam podem estar presentes em solos, resíduos industriais, matrizes aquáticas, alimentos, animais e nos seres humanos. Todavia, são poucos os estudos que abordam a respeito da colonização comunitária, assim como os que tratam a respeito da prevalência desse gene na comunidade. Dessa forma, nosso trabalho buscou descrever quais enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial estariam envolvidas na colonização comunitária e os seus determinantes genéticos. Para isso, voluntários que buscavam pronto atendimento sem histórico de internação recente foram convidados a participar do estudo. Os que aceitaram, forneceram *swabs* retais que foram submetidos a um teste de viabilidade e à pressão seletiva inicial por ceftriaxona (CRO; 1,5 µL/mL). Então, o cultivo obtido nesta etapa foi replicado em cefoxitina (32 µL/mL) e, em seguida, dois representantes de cada morfotipo bacteriano, selecionados. As amostras foram identificadas e avaliadas quanto à resistência à cefoxitina e amoxicilina/clavulanato. Por fim, foi realizada a detecção por PCR dos genes codificadores de pAmpC já descritos. Dos 228 *swabs* retais obtidos, 104 (45,6%) apresentaram crescimento em agar MacConkey suplementado com ceftriaxona. Após a réplica em cefoxitina seguido da seleção de pelo menos dois representantes de cada morfotipo, obteve-se um total de 231 bactérias recuperadas na vigência de cefoxitina e, destas, 82 (35,2%) eram enterobactérias. Desse grupo, 42 (51,2%) foram identificadas como espécies que não apresentam produção intrínseca de AmpC, sendo elas *E. coli* e *K. pneumoniae*. Observou-se que 33 (78,5%) bactérias desse grupo apresentavam resistência a cefoxitina e amoxicilina/ácido clavulânico, isoladas de 9 indivíduos, o que representou aproximadamente 4% de prevalência na população estudada. Dessas, 20 apresentaram resultado positivo na PCR para betalactamases do grupo CIT, e 3 para o grupo DHA. As bactérias confirmadas como produtoras de pAmpC foram isoladas de 5 indivíduos, o que representou 2,2% de prevalência na população estudada. Com relação ao antibiograma, a maior frequência de resistência

encontrada foi contra cefalosporinas (87,8%), seguido por quinolonas (69,7%), sulfametoxazol-trimetoprima (54,5%), aminoglicosídeos (45,4%) e monobactâmicos (30,3%). Ao todo, 23 perfis de antibiograma foram encontrados entre as 33 cepas testadas. Os resultados são preocupantes, uma vez que esses genes têm a capacidade de circular entre diferentes espécies, podendo representar um papel importante nas infecções relacionadas à assistência à saúde que decorram de uma eventual internação, e nas infecções comunitárias graves em humanos. A avaliação contínua dessa ocorrência é de fundamental importância, especialmente entre indivíduos mais suscetíveis, pois pode significar maior restrição na escolha do tratamento em eventuais infecções por esses organismos.

Palavras-chave: AmpC plasmidial; betalactamases; colonização comunitária; enterobactérias; resistência aos antimicrobianos

ABSTRACT

Jéssica Britto Gonçalves

Caracterização de enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial isoladas de colonização intestinal comunitária

Orientadora: Renata Cristina Picão

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Betalactamase enzymes are crucial mechanisms of antimicrobial resistance, especially concerning gram-negative bacteria capable of colonizing the gastrointestinal tract and causing infections. Bacteria from the *Enterobacteriaceae* family can acquire and express betalactamases with different structures and substrate spectra, including plasmid-mediated AmpC cephalosporinases (pAmpC). This group of enzymes confers resistance to penicillins, third-generation cephalosporins, monobactams, and cephamicins, remaining uninhibited by classical betalactamase inhibitors like clavulanic acid. Moreover, resistance is a significant health challenge beyond hospital settings. Both resistance-encoding genes and their carriers can be found in soils, industrial waste, aquatic environments, food, animals, and humans. However, few studies address community colonization and the prevalence of these genes in the community. Therefore, our work aimed to describe which plasmid-mediated AmpC-producing enterobacteria are involved in community colonization and their genetic determinants. Volunteers seeking immediate care without recent hospitalization history were invited to participate in this research project. Those who accepted it provided rectal swabs that were subjected to viability testing and initial selective pressure with ceftriaxone (CRO; 1.5 µL/mL). The obtained culture was then replicated in ceftiofuran (32 µL/mL), and two representatives of each bacterial morphotype were selected. Samples were identified and assessed for ceftiofuran and amoxicillin/clavulanate resistance. Finally, PCR detection of previously described pAmpC-encoding genes was performed. Of the 228 rectal swabs obtained, 104 (45.6%) showed growth on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone. After subculturing on ceftiofuran followed by the selection of at least two representatives of each morphotype, a total of 231 bacteria were recovered in the presence of ceftiofuran, and 82 (35.2%) of these were *Enterobacteriaceae*. Among this group, 42 (51.2%) were identified as species that do not have intrinsic AmpC production, namely *E. coli* and *K. pneumoniae*. It was observed that 33 (78.5%) bacteria in this group exhibited resistance to ceftiofuran and amoxicillin/clavulanic acid, isolated from 9 individuals, representing approximately 4% prevalence in the studied population. Out of these, 20 tested positive in PCR for CIT group betalactamases, and 3 for the DHA group. Bacteria identified as pAmpC producers were isolated from 5 individuals, representing a prevalence of 2.2% in the studied population. Regarding the antibiogram, the highest frequency of resistance was against cephalosporins (87.8%), followed by quinolones (69.7%), trimethoprim-sulfamethoxazole (54.5%), aminoglycosides (45.4%), and monobactams (30.3%). In total, 23 antibiogram profiles were found among the 33 tested strains. These results are concerning as these genes can circulate

among different species, potentially playing a significant role in healthcare-related infections following hospitalization and severe community infections in humans. Continuous evaluation of this occurrence is crucial, especially among more susceptible individuals, as it may impose greater restrictions on treatment choices for potential infections caused by these organisms.

Keywords: AmpC plasmidial; beta-lactamases; community colonization; enterobacteria; antimicrobial resistance.

RESUMO PARA LEIGOS

Jéssica Britto Gonçalves

Caracterização de enterobactérias produtoras de AmpC plasmidial isoladas de colonização intestinal comunitária

Orientadora: Renata Cristina Picão

Resumo simplificado da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A resistência aos antimicrobianos é um grande desafio para a saúde nos dias de hoje, uma vez que os microrganismos resistentes estão presentes dentro dos hospitais, mas também fora deles. Essa pesquisa observou que quatro em cada 100 pessoas que vivem na região metropolitana do Rio de Janeiro possuem bactérias no intestino capazes de sobreviver a diferentes antibióticos que são utilizados no tratamento de infecções causadas por elas. Para esse estudo, foram doados amostras de fezes de indivíduos que não apresentavam histórico de internação recente e foram atendidos na emergência de um hospital público e um privado em Niterói. Após a coleta, as bactérias encontradas foram testadas na presença de betalactâmicos, um grupo de antibióticos bastante utilizado para o tratamento de infecções causadas por diferentes microrganismos. Foi investigado, em seguida, se as bactérias apresentavam um gene de AmpC plasmidial, capaz de promover resistência a diferentes grupos de antibióticos e de se disseminar para outras bactérias. Das amostras testadas, 23 delas foram positivas e foi possível observar dois genes para betalactamases do tipo pAmpC diferentes.

O problema da resistência é de extrema relevância, uma vez que ela pode levar a dificuldade de encontrar a melhor alternativa para o tratamento das infecções, e promover falha terapêutica. Existem poucos estudos ainda que tratam a respeito do impacto que esses microrganismos resistentes podem causar fora do ambiente hospitalar, principalmente naqueles indivíduos mais fragilizados. Esse estudo chama a atenção para o potencial das bactérias presentes no intestino de pessoas da comunidade que são capazes de servir de reservatório e veículo para a disseminação dessas bactérias para o ambiente hospitalar, onde o impacto da resistência pode ser ainda maior.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma ilustrativo das duas principais classificações propostas para as betalactamases em 1980, por Ambler, e 1995, por Bush, Jacoby e Medeiros.....10
- Quadro 1:** Enzimas de pAmpC agrupadas de acordo com a origem cromossômica. Pérez-Pérez e Hanson, 2002.....12
- Figura 2:** Fluxograma correspondente aos resultados observados a partir da coleção bacteriana até a triagem presuntiva da produção de pAmpC.....25
- Figura 3:** Gel referente a corrida eletroforética para a PCR simplex confirmatória para as amostras positivas para o gene do grupo DHA.....26
- Figura 4:** Gel referente a corrida eletroforética para a PCR simplex confirmatória para as amostras positivas para o gene do grupo CIT.....26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do produto, alvo e termociclagem para a detecção de genes envolvidos na produção de AmpC plasmidial.....23
- Tabela 2** - Perfil de susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos de amostras recuperadas do TGI de indivíduos sem histórico de internação recente que apresentam pAmpC.....28
- Tabela 3** - Mecanismos de resistência a cefoxitina identificados nos microrganismos isolados e os respectivos voluntários.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina/Ácido clavulânico
AMI	Amicacina
ATM	Aztreonam
AMP	Ampicilina
BGN	Bacilos gram-negativo
BrCAST	do inglês, <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGM	Elementos genéticos móveis
ESBL	Betalactamases de espectro estendido
ETP	Ertapenem
FOS	Fosfomicina
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITU	Infecções no trato geniturinário
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF MS	do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MDR	do inglês, <i>multidrug resistance</i>
MER	Meropenem

MBL	Metalobetalactamase
NAL	Ácido nalidíxico
NIT	Nitrofurantoína
pAmpC	AmpC mediada por plasmídeo
PBP	do inglês, <i>penicillin-binding protein</i>
PCR	do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RAM	Resistência aos antimicrobianos
SUT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
TET	Tetraciclina
TGI	Trato gastrointestinal
THG	Transferência Horizontal de Genes
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
RESUMO PARA LEIGOS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Apresentação do problema	1
1.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.3 Betalactâmicos	3
1.4 Resistência aos betalactâmicos	5
1.5 AmpC	8
1.6 Disseminação de AmpC no ambiente e na comunidade	9
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 População incluída no estudo	15
4.2 Coleção de amostras	15
4.3 Confirmação da identificação das amostras	16
4.4 Detecção fenotípica da produção de AmpC	16
4.5 Detecção genotípica	17
4.6 Detecção dos genes codificadores de AmpC plasmidial	17
4.7 Eletroforese em gel de agarose	18
4.8 Antibiograma	18
5. RESULTADOS	21
5.1. Coleção bacteriana	21
5.3. Triagem presuntiva da produção de pAmpC	21
5.3. Teste de detecção do gene de pAmpC	22
5.4. Antibiograma e perfil de susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
9. ANEXO	46
ANEXO I: Parecer Consubstanciado do CEP	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

A resistência aos antimicrobianos é um problema global e um dos maiores desafios para a saúde pública no cenário atual, uma vez que ela não se limita ao ambiente hospitalar, e afeta não só os seres humanos, como também os animais e o meio ambiente. Isso ocorre devido a fatores como a utilização inadequada de antimicrobianos, a ausência ou a insuficiência de prevenção e controle de infecções, vigilância e monitoramento inadequados, assim como a falta de regulamentação e fiscalização do uso desses fármacos (McEwen e Collignon, 2018; CDC, 2019). Todos esses fatores promovem a emergência de bactérias resistentes e, como consequência, falha terapêutica quando antimicrobianos capazes de combater eventuais infecções por elas causadas não estão disponíveis no momento adequado. A resistência aumenta o índice de morbidade e mortalidade, dificultando também a prescrição profilática de antimicrobianos, além de ocasionar um aumento na duração de tratamentos e internações. Além de afetar a saúde dos pacientes, a resistência também acarreta prejuízo econômico, já que os indivíduos apresentam um maior período de internação, necessitam de diferentes medicamentos para tratar os efeitos causados pela própria infecção, além do custo dos antimicrobianos utilizados para o tratamento (Rocha, 2015; CDC, 2019).

Dessa forma, perante os problemas gerados pela resistência, torna-se necessário a vigilância epidemiológica, assim como planos de ações eficientes que possam lidar com a crise da resistência. Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde, em 2015, publicou o Plano de Ação Global em Resistência Antimicrobiana, que tem como objetivo ajudar a combater bactérias resistentes por meio de orientações — para que seja feito o controle e a redução do avanço da resistência — e sugestões de medidas, como o diagnóstico mais rápido e preciso, pesquisa a respeito da incidência, prevalência e a ocorrência desses organismos, e os padrões geográficos relacionados (WHO, 2015, 2017). Dentre as ações necessárias para que se tenha uma mudança, inclui-se a necessidade da melhora da conscientização e a compreensão a respeito da resistência aos antimicrobianos, por meio de comunicação, educação e treinamentos eficazes; o fortalecimento do conhecimento e de bases científicas por meio da vigilância e da pesquisa; a redução da incidência de infecções por meio de medidas eficazes de saneamento, higiene e prevenção das infecções; a otimização do uso de antimicrobianos na saúde humana e animal; e a realização de investimentos sustentáveis que leve em consideração a necessidade de todos os países, além do aumento de investimento em

novos medicamentos, ferramentas diagnósticas, vacinas e outras intervenções (PAN-BR, 2019). Por fim, junto a todos esses fatores, é preciso ainda que exista uma abordagem *One Health*, uma perspectiva que envolve interações entre diferentes esferas ambientais, e necessita do esforço colaborativo de diversos especialistas da saúde, visando alcançar uma melhor saúde e bem-estar para as esferas humana, animal e ambiental (CDC, 2018; McEwen e Collignon, 2018).

Todavia, apesar de todas as recomendações do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)/Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), e por mais que se saiba que diferentes fatores associados à comunidade também podem impulsionar a resistência, são poucos os estudos que avaliam a resistência no contexto de colonização, sobretudo na comunidade, tornando-se necessário estudos como esse, capazes de dimensionar esse problema.

1.2 *Enterobacteriaceae*

Os bacilos gram-negativos (BGN) classificados na família *Enterobacteriaceae* compõem um grupo diverso de bactérias ubíquas, facultativas, não formadoras de esporos. Geralmente, apresentam relação de comensalismo com os seres humanos e animais, embora possam também estar associados a diversas infecções. Entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae* com importante potencial patogênico destacam-se os gêneros: *Escherichia* e *Klebsiella*. O primeiro é composto por pequenos bastonetes, móveis por flagelos peritríquios ou imóveis, encapsulados (Ewing, Farmer e Brenner, 1980; Pazzani, Roberts e Boulnois, 1991); enquanto o segundo é composto por bastonetes imóveis e encapsulados (Gujarati *et al.*, 2020).

Para o tratamento das infecções causadas pelas enterobactérias, podem ser empregados os antimicrobianos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, polimixinas e betalactâmicos (Martins *et al.*, 2019). No entanto, a ocorrência de cepas resistentes às diferentes alternativas é cada vez mais comum.

Um estudo realizado por um grupo de colaboradores em resistência a antimicrobianos de diferentes regiões do globo apresentou estimativas abrangentes de carga de resistência aos antimicrobianos em 204 países, para 23 patógenos e 88 associações entre microrganismos e antimicrobianos. Nesta circunstância, foi estimado que, em 2019, cerca de 1,3 milhões de mortes foram atribuídas à resistência aos antimicrobianos, e cerca de 5 milhões de mortes foram associadas a esse fenômeno. Além disso, considerando o número de mortes num cenário relacionado a infecções respiratórias inferiores, de corrente sanguínea e

intra-abdominais, as enterobactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* se destacam. Essas espécies foram apontadas como as principais responsáveis por grande parcela das mortes atribuídas ou associadas à resistência em todo o mundo (*Antimicrobial Resistance Collaborators*, 2022).

1.3 Betalactâmicos

Os betalactâmicos são agentes bactericidas capazes de interromper a formação da parede celular bacteriana devido à ligação covalente que realiza com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*). A ligação dos betalactâmicos a essas proteínas resulta na inibição da transpeptidação do peptidoglicano, impedindo a formação da parede celular que, enfraquecida, levará à autólise bacteriana (Bush e Bradford, 2016). Todos os antimicrobianos dessa classe apresentam em comum o anel betalactâmico que, para ter atividade, precisa estar ligado a um radical. Todavia, dependendo do radical, tem-se a origem de diferentes grupos de betalactâmicos, classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de betalactamases. Além disso, é importante ressaltar que essas alterações químicas modificam as características dos antibióticos, como a afinidade pelo receptor e espectro de ação (Janaina *et al.*, 2019).

A penicilina é obtida através da fermentação de fungos do gênero *Penicillium*. A penicilina G foi o primeiro antibiótico utilizado clinicamente, e é o tipo de penicilina mais utilizado na medicina humana, porém é um alvo muito suscetível a betalactamases. A descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) — núcleo central da penicilina G — possibilitou a criação das penicilinas semissintéticas. Uma vez que radicais são adicionados sinteticamente ao 6-APA, são originadas diversas substâncias com diferentes espectros de ação antimicrobianos. Dentre as penicilinas semissintéticas, existem as resistentes às primeiras betalactamases descritas, como a oxacilina; as benzilpenicilinas, como a penicilina V — biossintética e pode ser administrada oralmente — e penicilina G; e as aminopenicilinas, composta por ampicilina e a amoxicilina que, diferente dos citados anteriormente, apresentam ação sobre bactérias gram-negativas (Tavares, 2014; Janaina *et al.*, 2019).

As cefalosporinas são produzidas por fungos do gênero *Cephalosporium* e, dentre as produzidas, a mais importante é a cefalosporina C. Com a adição de diferentes grupos laterais ao núcleo central ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), originou-se as cefalosporinas semissintéticas, compostas por diferentes substâncias com diferentes espectros de ação antimicrobianos. Existem cefalosporinas de primeira a quinta geração, sendo as de primeira ativas contra algumas bactérias gram-positivas. Essas cefalosporinas de primeira geração não possuem atividade contra BGN, como *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. visto que

apresentam susceptibilidade à hidrólise realizada pelas betalactamases intrinsecamente produzidas por essas bactérias. Dentre os antimicrobianos pertencentes a esse grupo, existem aqueles que são absorvidos por via parental, como cefalotina e cefazolina, e os que são absorvidos por via oral, como cefalexina e cefadroxil. As de segunda geração apresentam antimicrobianos como cefaclor e cefuroxima; possuem um espectro de ação mais amplo, então, além de possuírem atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, elas são mais resistentes às betalactamases se comparados aos da primeira geração. A terceira geração inclui antimicrobianos como cefoperazona, ceftriaxona e cefotaxima; são capazes de induzir a produção de betalactamases intrínsecas do tipo AmpC em algumas espécies, como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*; e de atravessar a barreira hematoencefálica. As de quarta geração tem como antimicrobiano representante a cefepima. Possuem ação eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, e não são hidrolisadas e nem induzem de forma eficiente as betalactamases produzidas intrinsecamente por enterobactérias. A quinta geração possui o objetivo de melhorar o espectro de ação principalmente contra as bactérias gram-positivas que conseguem resistir a outros betalactâmicos. Dentre os antimicrobianos dessa geração, o ceftobiprole tem ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, todavia, não é eficaz contra *Enterococcus faecium*. A ceftarolina-fosamil apresenta ação contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e cepas resistentes a vancomicina. Entretanto, apresenta atividade pouco expressiva contra gram-negativos não fermentadores da glicose, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Existem ainda o subgrupo betalactâmico das cefamicinas, como a cefoxitina, semelhante estruturalmente às cefalosporinas de segunda geração e com amplo espectro de ação, sendo ativas contra BGNs, bactérias gram-positivas e anaeróbias (Tavares, 2014; Bush e Bradford, 2016; Janaina *et al.*, 2019; Tamma *et al.*, 2019).

Os carbapenemas são originariamente naturais, produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces* e compostos por antimicrobianos como imipenem, ativos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, inclusive as não fermentadoras da glicose, e anaeróbias. Moléculas semissintéticas foram desenvolvidas por modificação molecular dos carbapenemas naturais, se apresentando quimicamente mais estáveis do que o imipenem, permitindo assim uma vida útil mais longa para o medicamento formulado. O meropenem é um carbapenêmico de segunda geração, que possui o grupo 1 β -metil na sua formulação, o que o mantém estável. Além disso, esse antimicrobiano é ativo contra bactérias gram-positivas e BGNs. O ertapenem possui uma meia-vida mais longa com relação a sua eliminação devido à alta ligação às

proteínas séricas e, portanto, pode ser administrado de forma eficaz uma única vez ao dia, e é eficiente contra enterobactérias. Vale ressaltar, por fim, que os carbapenemas possuem um amplo espectro de ação e, devido à presença de uma cadeia lateral de hidroxietila, são capazes de se manterem estáveis e resistirem à ação de muitos tipos de enzimas betalactamases (Tavares, 2014; Bush e Bradford, 2016).

Os monobactâmicos são monocíclicos, constituídos apenas pelo anel betalactâmico e um único radical ligado a esse anel, o que os diferencia dos outros betalactâmicos. Esse grupo é representado pelo aztreonam, que possui atividade contra BGNs graças a sua afinidade com a PBP 3, o que faz com que a síntese da parede celular seja inibida. Além disso, ele tem a capacidade de resistir a inativação e se manter estável contra a hidrólise de algumas betalactamases, sejam elas de origem cromossômica ou plasmidial (Tavares, 2014; Bush e Bradford, 2016).

Com o objetivo de impedir a ação das enzimas betalactamases, responsáveis por reduzir a atividade dos betalactâmicos utilizados para tratamento, foram desenvolvidos os inibidores de betalactamases. Essas substâncias são capazes de se ligar às enzimas betalactamases, levando a sua inativação e, assim, preservar a ação do antimicrobiano contra uma bactéria resistente a ele devido à produção de betalactamases. Além disso, entre as substâncias inibidoras de betalactamases em uso clínico estão o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, usadas paralelamente a outro betalactâmico, uma vez que sozinhas não são eficientes. O ácido clavulânico atua juntamente com penicilinas e cefalosporinas contra algumas bactérias que apresentam betalactamases de origem plasmidial; o sulbactam é geralmente combinado a ampicilina, mas também pode ser combinado com cefoperazona para atuar contra bactérias não fermentadoras e anaeróbias; o tazobactam é combinado com a piperacilina e a sua vantagem é que atua contra anaeróbios, enterococos e enterobactérias (Tavares, 2014; Bush e Bradford, 2016).

1.4 Resistência aos betalactâmicos

As bactérias podem apresentar diferentes mecanismos para resistir a ação bactericida dos antimicrobianos betalactâmicos, os quais podem ser adquiridos mediante i) mutação ou modulação da expressão de genes intrínsecos, como a alteração do alvo do antimicrobiano na célula, a perda ou redução da expressão de porinas que dificulta a passagem do antimicrobiano pela membrana externa, a hiperexpressão de bombas de efluxo que expõem o antimicrobiano da célula, e a expressão aumentada de enzimas intrínsecas que degradam o antimicrobiano; ou ii) por meio da transferência horizontal de genes (THG), o que faz com

que os organismos possam apresentar, por exemplo, enzimas que realizam a hidrólise do anel betalactâmico, inativando os antimicrobianos — mecanismo considerado principal em enterobactérias. Vale ressaltar ainda que a atuação em conjunto de diferentes mecanismos de resistência torna as infecções ocasionadas por essas cepas cada vez mais difíceis de tratar (Arzanlou, Chai e Venter, 2017; CDC, 2019)

A capacidade de receber e transferir o material genético por meio da THG é um fator importante na evolução de cepas resistentes aos antimicrobianos. Os mecanismos para tal envolvem a transdução, em que o material genético pode ser transferido por meio de fagos; conjugação, em que a transferência ocorre por meio da conexão das bactérias e troca de plasmídeos; e transformação, mecanismo no qual o material genético liberado por bactérias, vivas ou não, no ambiente, pode ser capturado por outra bactéria (CDC, 2019). Ademais, existem ainda as vesículas, um mecanismo pouco conhecido que envolve vesículas extracelulares (VE) capazes de carregar e entregar esses genes por meio de uma lise espontânea, que permite que o conteúdo se difunda; ou por meio da ligação ao alvo, transferindo por meio da lise proximal, internalização ou fusão (Kulp e Kuehn, 2010; Riaud e Carroll, 2020). Essas transferências podem ocorrer entre bactérias da mesma espécie, ou por bactéria de gêneros distintos e, dessa forma, tem-se o acúmulo de genes e elementos genéticos móveis (EGM) que codificam, por exemplo, mecanismos de resistência (Suárez e Munté, 2009).

A expressão de betalactamases intrínsecas ou adquiridas confere aos microrganismos um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos. Isso porque essas enzimas têm a capacidade de hidrolisar o anel betalactâmico antes que eles realizem a interação com as PBPs e, dessa forma, não ocorra a inibição da síntese da parede celular bacteriana (Nakano e Campos, 2016).

As betalactamases possuem duas principais classificações, resumidas na **figura 1**: a molecular, que considera a sequência de aminoácidos e o sítio ativo das enzimas, e distribui as betalactamases em quatro classes (A-D), proposta por Ambler (1980); e a funcional, que considera a afinidade com os substratos e o perfil de inibição, proposta por Bush, Jacoby e Medeiros (1995). Todavia, Bush e Jacoby (2010) propuseram uma atualização da classificação funcional, dividindo-a em três grupos principais com seus respectivos subgrupos. O grupo 1 é composto pelas cefalosporinases pertencentes à classe molecular C, classificadas como AmpC, e presentes no cromossoma de diversas enterobactérias e outros organismos, como está relatado no tópico seguinte; ativas contra cefalosporinas e cefamicinas, resistentes à inibição pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, e com afinidade pelo

aztreonam. Algumas das famílias desse grupo são CMY, ACT, DHA, FOX, MIR. O grupo 2 é composto por serinobetalactamases, que englobam as classes moleculares A e D e diversos subgrupos, com relevância para o 2be, composto pelas betalactamases de espectro estendido (ESBLs). Esse subgrupo é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas do subgrupo 2b e também oximino-betalactâmicos, e são inibidas pelo ácido clavulânico. Vale ressaltar ainda que, diferente das AmpC, as ESBLs não possuem afinidade com as cefamicinas, como a cefoxitina. Recebe destaque também, dentro do grupo 2, o subgrupo 2f, composto pelas carbapenemases, principalmente as que são codificadas por plasmídeos. O grupo 3 é composto pelas metalobetalactamases (MBL) que estão na classe molecular B, podem hidrolisar os carbapenemas, e podem ser inibidas por quelantes de íons metálicos como o EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) e o ácido dipicolínico. De acordo com a classificação molecular, as MBLs são divididas de B1 a B3 e, de acordo com o grupo funcional, de 3a a 3c. Vale destacar que, no subgrupo 3a (subclasse B1) existem enzimas disseminadas globalmente que aparecem mais frequentemente em *Enterobacteriaceae*, como as da família NDM (do inglês, *New Delhi MBL*) (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Bush e Jacoby, 2009, 2010).

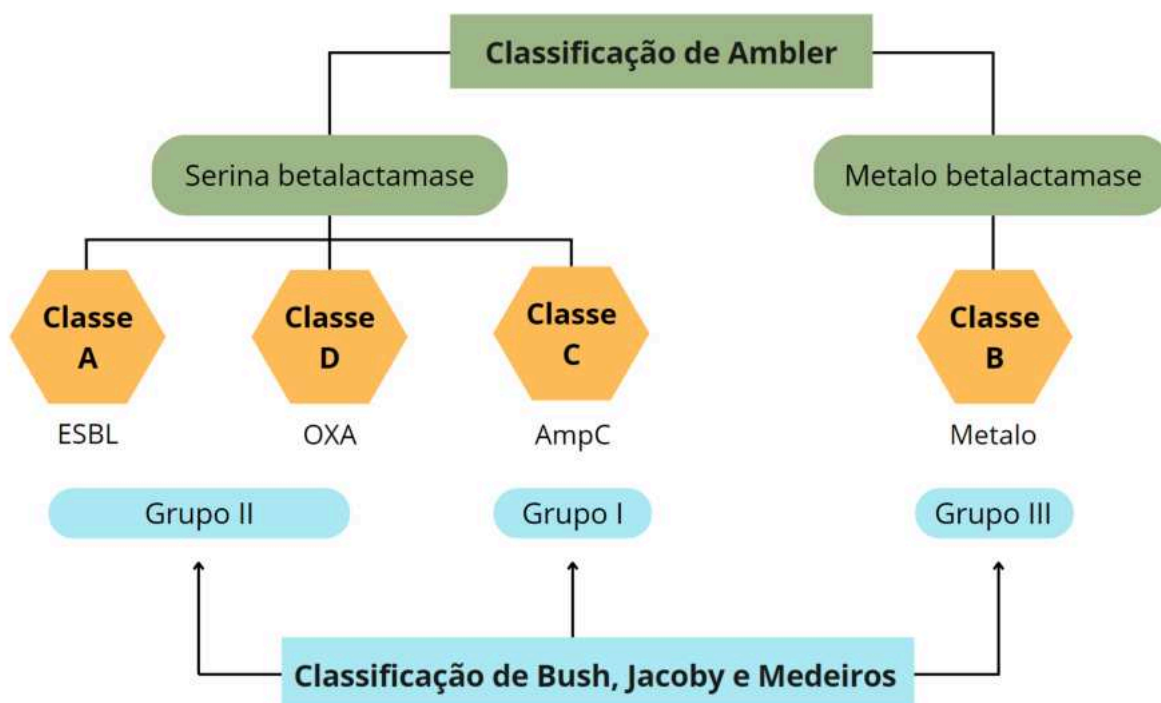


Figura 1: Fluxograma ilustrativo das duas principais classificações propostas para as betalactamases em 1980, por Ambler, e 1995, por Bush, Jacoby e Medeiros. Adaptado de Rijal, 2021.

1.5 AmpC

As betalactamases do tipo AmpC são cefalosporinases de classe C, clinicamente relevantes, pois são capazes de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração, monobactâmicos e cefamicinas, e não são inibidas por inibidores de betalactamases como o ácido clavulânico (Paterson e Bonomo, 2005; Al-Agamy e El Mahdy Shibl, 2016; Tooke *et al.*, 2019). Essas enzimas estão codificadas no cromossoma de muitas espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp, bem como em espécies de outras famílias, como *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e *Aeromonas* spp. (Najjuka *et al.*, 2020), podendo ser induzidas pela exposição a betalactâmicos e hiperexpressas devido a mutações em genes reguladores, como *ampD* (Tooke *et al.*, 2019). Vale ressaltar que a espécie *E. coli* também pode possuir AmpC cromossômica, no entanto, não são induzíveis, sendo expressas em níveis basais e reguladas por promotor e atenuadores fracos. Outras enterobactérias, como *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp, que não possuem AmpC cromossômica, podem adquiri-la por meio de plasmídeos, assim como a *E. coli* (Najjuka *et al.*, 2020) por THG, — através de EGM — altamente transferíveis entre espécies (Reuland *et al.*, 2015; Tooke *et al.*, 2019; Najjuka *et al.*, 2020). Esses plasmídeos geralmente carregam consigo, além dos genes que codificam as enzimas da família AmpC — com destaque para CMY, FOX e DHA — determinantes genéticos que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos, o que os torna mais relevante clinicamente (Tooke *et al.*, 2019). Essas enzimas são agrupadas de acordo com a sua similaridade com o gene de origem cromossômica, incluindo *E. cloacae* para o grupo EBC, *C. freundii* para o grupo CIT, *M. morganii* para o grupo DHA e *H. alvei* para o grupo ACC; no entanto, existem grupos que apresentam uma origem desconhecida (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). A divisão desses grupos com as suas enzimas e origem correspondentes podem ser observadas no **quadro 1**.

Quadro 1: Enzimas de pAmpC agrupadas de acordo com a origem cromossômica. Pérez-Pérez e Hanson, 2002.

Grupos	Enzimas	Origem
CIT	LAT-1 a LAT-4, CMY-2 A CMY-7 e BIL-1	<i>Citrobacter freundii</i>
DHA	DHA-1 e DHA-2	<i>Morganella morganii</i>
ACC	ACC	<i>Hafnia alvei</i>
EBC	MIR-1T e ACT-1	<i>Enterobacter cloacae</i>
FOX	FOX-1 e FOX-5b	origem desconhecida
MOX	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	origem desconhecida

1.6 Disseminação de AmpC no ambiente e na comunidade

A disseminação de bactérias e genes que promovem resistência aos antimicrobianos no meio ambiente é, em parte, resultado de atividades humanas que geram pressão seletiva, sendo essencial prevenir e controlar as infecções, assim como reduzir a prescrição excessiva de antimicrobianos, melhorar o saneamento e hábitos de higiene (McEwen e Collignon, 2018). Entre as medidas que podem contribuir para desacelerar a disseminação da resistência, inclui-se o uso racional de antibióticos e biocidas em instituições de saúde e na comunidade, bem como nas práticas agropecuárias (Colomer-Lluch, Jofre e Muniesa, 2011; Wales e Davies, 2015; Singer *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2021). Essas medidas são importantes, pois os genes de resistência e as bactérias que os carregam podem ser observadas e se acumular nas águas de rios, em resíduos industriais, residenciais e agrícolas que possuem tratamento inadequado, no solo, e nos produtos da cadeia alimentícia (Wales e Davies, 2015; Singer *et al.*, 2016; McEwen e Collignon, 2018). A ocorrência de microrganismos que apresentam resistência no ambiente pode favorecer a formação de reservatórios de resistência e impulsionar a evolução desse fenômeno, visto que a saúde humana, animal e ambiental estão conectadas (McEwen e Collignon, 2018).

Existem relatos da ocorrência de bactérias resistentes, em especial as produtoras de pAmpC, na cadeia alimentar. Um estudo realizado no Rio de Janeiro (2015), Brasil, avaliou carcaças de frango congeladas, obtidas de quatro produtores brasileiros em mercados de varejo, incluindo alimentos distribuídos no Brasil e internacionalmente. De 136 amostras de *E. coli* selecionadas, 46 foram resistentes à cefoxitina e à amoxicilina/clavulanato, desse modo apresentando um fenótipo sugestivo para a produção de AmpC, e abrigavam o gene *bla*_{CMY-2}. Foi observado ainda que o gene *bla*_{CMY-2} foi transferido por conjugação, e que as amostras que o portavam apresentavam uma variedade de perfis de resistência a antimicrobianos não-betalactâmicos (Botelho *et al.*, 2015).

Betalactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídeos também foram identificadas em animais de companhia. Um estudo em Taipei (2021), no Taiwan, realizou uma pesquisa de cepas de *E. coli* produzindo pAmpC em cães e gatos. Foram ao todo 50 amostras isoladas, sendo 41 de cães e nove de gatos, em que oito (16%) continham genes pAmpC do grupo *bla*_{CMY-2} — grupo mais prevalente e geograficamente diversificado de enzimas pAmpC —; ademais, as amostras positivas para pAmpC exibiram com mais frequência um fenótipo de multirresistência do que as amostras que não carregavam nenhum gene. Além disso, foi

observado que a maioria dos genes codificadores de pAmpC eram transferíveis, e estavam localizados em elementos genéticos móveis, o que tem importantes implicações para a saúde pública devido à sua provável facilidade na disseminação (Liu, Kuan e Yeh, 2021).

No Brasil, um estudo realizado por Tufic-Garutti e colaboradores, em 2021, procurou determinar a frequência de *Enterobacterales* resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR-E, do inglês *multidrug-resistant Enterobacterales*) presentes no trato gastrointestinal de viajantes, entre 2015 e 2019, que partiam do Rio de Janeiro. Foi observado que, de 210 indivíduos analisados, 26 (12%) estavam colonizados por MDR-E. Além disso, o gene *bla_{CMY-2}* foi detectado em três indivíduos antes da viagem e o gene *bla_{CMY-10}* foi detectado em um outro indivíduo, também pré-viagem, representando 2% dos participantes do estudo (Tufic-Garutti *et al.*, 2021).

A descrição da ocorrência de pAmpC na comunidade não é exclusiva do Brasil. No Taipei (2015), Taiwan, pacientes diagnosticados com infecção no trato urinário que se iniciaram na comunidade, causados por *Enterobacteriaceae*, foram pesquisados para a ocorrência de bactérias produtoras desse grupo de betalactamases. Das 323 enterobactérias isoladas, 218 (67,5%) eram *E. coli* e 25 (7,7%) *K. pneumoniae*. Dessas, 50 amostras foram fenotipicamente positivas para AmpC, em que *E. coli* foi o organismo mais comum (60%), seguido por *K. pneumoniae* (8%). Observou-se, ainda, que as amostras produtoras de AmpC eram multirresistentes — forma mais comumente encontrada em ITUs e em indivíduos que tiveram exposição prévia a antimicrobianos com mais frequência — e que o histórico anterior de acidente vascular cerebral e o uso de fluoroquinolonas e cefamicina estavam associados à aquisição de *Enterobacteriaceae* produtoras de pAmpC. Por fim, viu-se que os grupos AmpC transmitidos por plasmídeos mais comumente detectados foram CIT, seguidos por DHA, EBC e MOX, e três amostras abrigavam dois tipos diferentes de genes AmpC (Lee *et al.*, 2015).

Um estudo realizado em Amsterdã (2015), na Holanda, obteve amostras fecais de 550 voluntários recrutados da comunidade, logo eles não haviam ido ao médico e nem sido hospitalizados. Como resultado, obteve-se 7 (1,3%) *E. coli* positivas para pAmpC, sendo o gene *bla_{CMY-2}* o mais frequente (Reuland *et al.*, 2015). Um outro estudo feito no Norte do Chipre (2019) coletou amostras de fezes e *swabs* retais de 500 indivíduos que moravam no Chipre por pelo menos um ano e não foram hospitalizados. Do total de participantes, 15 (3,0%) estavam colonizados com *Enterobacteriaceae* produtora de pAmpC, e as amostras isoladas foram identificadas como *E. coli* (86,7%) e *K. pneumoniae* (13,3%). Viu-se ainda a presença de multiresistência em amostras de *Enterobacteriaceae*, e que o antigo uso de antibióticos ou a internação hospitalar parecem ser os principais contribuintes para a presença

de bactérias resistentes nas fezes (Ruh *et al.*, 2019). Finalmente, um estudo realizado na Uganda (2020) recolheu fezes e urina de indivíduos que frequentavam ambulatórios na área rural e urbana, para que a microbiota fosse analisada. Foram selecionadas 985 enterobactérias; destas, 129 (13,1%) eram produtoras de AmpC, sendo 116/930 *E. coli* (12,5%) e 13/55 *Klebsiella* (23,6%). Os autores relatam, ainda, que quando estratificado por fenótipo de resistência, de 184 amostras resistentes à cefoxitina, 129 (70%) eram produtores de AmpC; e das 209 amostras resistentes a amoxicilina/clavulanato e cefoxitina, 129 (61,7%) eram produtores de AmpC. Quando avaliaram a presença de pAmpC, foi observado uma prevalência geral em enterobactérias de 10% (98/985); destas, 58 (59%) eram resistentes a um antibiótico betalactâmico e a duas outras classes de antibióticos não-betalactâmicos comumente usados, sendo consideradas, portanto, multirresistentes. (Najjuka *et al.*, 2020).

Poucos são os estudos brasileiros acerca da disseminação de pAmpC em instituições de saúde. Um estudo sobre esse tema conduzido no Brasil, avaliou a prevalência de pAmpC entre *Enterobacteriaceae* isoladas de um hospital terciário público de São Paulo, que incluiu 41 amostras de *E. coli*, cinco *Klebsiella oxytoca*, 65 *K. pneumoniae*, 18 *P. mirabilis* e quatro *Salmonella* spp.. O estudo encontrou uma taxa de produção de pAmpC de 0,75%. Um outro estudo, também realizado no Brasil, avaliou a frequência de pAmpC em *E. coli* isoladas de culturas de urina de pacientes ambulatoriais e pacientes internados. A frequência foi de 0,46% em pacientes ambulatoriais e 1,8% em pacientes internados, e o gene detectado com maior frequência foi o *bla_{CMY-2}* (Sampaio e Gales, 2016). Ademais, em outros países os estudos também são poucos. Um estudo realizado na Índia (2012), coletou amostras de hemocultura, urina e outros fluidos corporais, de pacientes hospitalizados obtidos em seis hospitais diferentes no período de setembro de 2002 a janeiro de 2010, com o objetivo de determinar a ocorrência do gene de pAmpC e os seus tipos dentre os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*. De 241 bactérias isoladas, 92 (38,1%) apresentaram resultado positivo na detecção do gene de pAmpC, no qual 60 eram *E. coli* e 32 *K. pneumoniae*. Dentre os grupos de genes observados, aquele que apresentou maior prevalência foi DHA (46,7%), sendo 24 (55,8%) em *E. coli* e 19 (44,1%) em *K.pneumoniae*, seguido do grupo CIT (38%), sendo 24 (68,5%) em *E.coli* e 11 (31,4%) em *K. pneumoniae*. Ainda foi detectado o grupo MOX em 14,1% dos isolados, seguido do gene ACC em apenas um isolado (Mohamudha, Harish e Parija, 2012). Um outro estudo realizado em Meerut, na Índia (2023), coletou amostras de urina de indivíduos com ITU de diferentes idades, no período de maio de 2012 a abril de 2020, a fim de investigar a prevalência de genótipos de pAmpC em *E. coli*. De 312 bactérias isoladas, 152 (48,72%) apresentaram resistência à cefoxitina no qual foram testadas para a presença de um gene de

pAmpC. Obteve-se 56 (36,44%) isolados positivos, estando maior quantidade o grupo CIT (57,14%) (Rehana, Pandey e Singh, 2023). Por fim, no estudo realizado em um hospital de Kathmandu, no Nepal (2020), foram coletadas amostras de urina, pontas de cateter, sangue, pus e feridas de indivíduos, no período de junho de 2017 a janeiro de 2018, com o objetivo de determinar a prevalência dos grupos CIT e DHA em isolados bacterianos gram-negativos. Das 1151 amostras clínicas coletadas, 226 foram classificadas como gram-negativas, no qual 91 foram identificadas como produtoras de AmpC. Destas, 82 (90,1%) foram positivas para o grupo CIT e 80 (87,91%) para DHA, encontradas com maior prevalência em *E. coli*, representando 30,6% e 31,3%, respectivamente (Aryal *et al.*, 2020).

A ocorrência de produtores de pAmpC na comunidade pode alimentar a disseminação desse grupo de enzimas nas instituições de saúde, locais onde a resistência tem seu impacto para a saúde extensivamente documentado, especialmente para os indivíduos mais suscetíveis. Todavia, não existem estudos que avaliem a rota de inserção de pAmpC nos hospitais.

2. JUSTIFICATIVA

A família *Enterobacteriaceae* é composta de organismos com grande potencial patogênico, e que possuem diferentes mecanismos de resistência a antimicrobianos, entre os quais o mais estudado frente aos betalactâmicos é a produção de betalactamases. Essas enzimas exercem um papel importante nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e nas infecções comunitárias graves em humanos. Podem ser codificadas por genes localizados no cromossomo ou em plasmídeos que são transferidos por meio de THG para outras espécies, o que leva a presença de cada vez mais bactérias resistentes a diferentes classes de antimicrobianos. Nesse contexto, as pAmpC recebem destaque devido a ampla gama de substratos betalactâmicos com quem possuem afinidade e à sua capacidade de disseminação horizontal.

Além disso, a escassez de novos fármacos para o tratamento dessas infecções dificulta ainda mais o seu tratamento, contribuindo para o aumento da morbidade, mortalidade pelas infecções, e dos seus custos financeiros, diretos e indiretos.

Os microrganismos que contêm genes de resistência aos antimicrobianos estão disseminados no ambiente extra-hospitalar, em águas residuais, resíduos industriais, solos, vegetações, animais domésticos, de criação e silvestres, e nos alimentos que são consumidos diariamente pelos indivíduos. Apesar disso, não se sabe muito sobre como essa contaminação pode afetar tanto a vida de pessoas consideradas saudáveis, quanto daquelas que se apresentam em condições vulneráveis. Entretanto, sabe-se que as consequências da disseminação ambiental e comunitária da resistência é expressa principalmente nas instituições de saúde.

Considerando os aspectos acima apresentados e a presença de poucos estudos na literatura científica que caracterizaram cepas de enterobactérias produtoras de pAmpC oriundas de colonização comunitária, principalmente no Brasil, é que esse estudo foi planejado. Ao conhecer a dimensão da colonização do TGI de seres humanos que buscam pronto atendimento e não apresentam histórico de internação, as cepas envolvidas e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, podemos evidenciar uma rota de entrada da RAM nos hospitais, e auxiliar a tomada de decisão na implementação de melhores medidas de controle da disseminação extra e intra-hospitalar, e de protocolos de tratamento empírico de infecções.

3. OBJETIVO

Caracterizar as enterobactérias produtoras de pAmpC recuperadas do TGI de indivíduos que buscam pronto atendimento e não apresentam histórico de internação recente quanto às espécies bacterianas, genes envolvidos e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.1 Objetivos específicos

- Identificar as espécies de enterobactérias oriundas de colonização do TGI dos voluntários com fenótipo compatível para a produção de pAmpC;
- Descrever os genes envolvidos na produção de pAmpC;
- Determinar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas produtoras de pAmpC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População incluída no estudo

A população estudada incluiu voluntários adultos que se apresentaram em um posto de pronto atendimento de dois hospitais — um público e um privado — da Região Metropolitana do Rio de Janeiro entre novembro de 2021 a dezembro de 2022, que consentiram em participar do estudo e fornecer um swab retal auto coletado. O critério de exclusão foi o registro de hospitalização nos últimos seis meses e a ausência de crescimento bacteriano na amostra fornecida. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 46762621.2.0000.5455, conforme o **anexo I**.

4.2 Coleção de amostras

Após o recebimento, os *swabs* passaram pelo teste de viabilidade bacteriana por meio de *spots* em uma placa de Petri (90x15mm) composta por Ágar Triptona de Soja (TSA). Essa etapa foi necessária para que fosse possível garantir que, caso as amostras não apresentassem crescimento na placa com a pressão seletiva, fosse devido à ausência dos microrganismos com o fenótipo sob investigação, e não em decorrência de um *swab* mal ou não coletado. Dessa forma, todos os voluntários cujos *swabs* que não apresentaram crescimento na etapa de viabilidade foram excluídos do estudo. Em seguida, o *swab* foi semeado, através de semeadura confluenta, em uma placa de Petri de mesmo tamanho contendo 20 mL de ágar MacConkey suplementada com ceftriaxona (CRO; 1,5 µL/mL) para a observação presuntiva da presença de betalactamases. Essas placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas, em aerobiose, e observou-se, ao final, se houve crescimento na placa sem pressão seletiva e na presença de ceftriaxona.

As placas que apresentaram crescimento em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona foram submetidas à técnica do carimbo (*Replica plating*). Elas foram pressionadas em um veludo estéril — testado para esterilidade por meio do carimbo em uma placa de Ágar MacConkey sem antimicrobiano — e, posteriormente, as colônias foram replicadas em outras cinco placas. Dessas, a primeira e a última foram placas de Petri (90x15mm) com 20 mL de Ágar MacConkey sem suplementação de antimicrobiano, a fim de garantir o controle tanto do crescimento quanto da semeadura, e as outras três placas possuíam o mesmo volume de meio de cultura, porém acrescidos de cefepima (CPM; 16 µL/mL), cefoxitina (FOX; 32 µL/mL) e imipenem (IPM; 4 µL/mL), o que nos permitiu observar de forma presuntiva, bactérias

produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase, respectivamente. Após a realização da técnica, elas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas, em aerobiose.

A partir desse processamento, foram selecionados, pelo menos, dois representantes de cada morfotipo para repique e armazenamento, e ao final, obteve-se um total de 231 cepas recuperadas da pressão seletiva por cefoxitina, oriundas de 58 voluntários.

4.3 Confirmação da identificação das amostras

Todas as 231 cepas bacterianas recuperadas da pressão seletiva por cefoxitina passaram por uma confirmação da identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), com auxílio do aparelho Microflex LT e do *software* Biotyper 3.0, mediante as instruções do fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para isso, inicialmente as amostras foram reativadas em uma placa de Petri (60x15mm) contendo 10 mL de CHROMagar Orientation (Difco, Michigan, EUA) e, após a realização da semeadura por esgotamento, foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 - 24 horas em aerobiose. Confirmada a pureza da cultura, uma colônia isolada foi depositada em um poço da placa do equipamento, seguida de 1 μL de ácido fórmico (70%) (Sigma, St Louis, EUA) — para a exposição dos peptídeos — e, após a secagem, 1 μL de matriz (ácido hidroxicinâmico) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para ionizá-la. O resultado foi interpretado através do *score* indicado com base no nível de similaridade existente entre a espécie a ser identificada e uma amostra de referência presente no banco de dados vigente. Foi considerada a identificação de grande confiabilidade quando o *score* obtido foi entre 2 e 3. No caso de *score* abaixo do desejado a testagem para identificação foi refeita.

4.4 Detecção fenotípica da produção de AmpC

A detecção presuntiva da produção de AmpC foi realizada através do teste de disco-difusão, somente para *E. coli* e *Klebsiella* spp., as quais não expressam cefalosporinases de forma intrínseca. Inicialmente, foi realizada uma suspensão em 3 mL de solução salina (NaCl - 0,85%), de acordo com a escala 0,5 de McFarland (que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para cada uma das amostras. Em seguida, com auxílio de um *swab* estéril, a amostra foi semeada, através da técnica de semeadura confluenta, em uma placa de Petri de tamanho 90x15 mm contendo 20 mL de ágar Mueller-Hinton (Difco, Michigan, EUA). Os discos contendo amoxicilina/ácido clavulânico (30/10 μg) e cefoxitina (30 μg) foram aplicados e as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$

durante 16-18 horas em aerobiose. Os resultados foram analisados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). Para o controle desse teste, as amostras utilizadas foram *E. coli* PHP, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. A resistência aos dois discos testados foi considerada como teste presuntivo positivo para a produção de AmpC (Peter-Getzlaff *et al.*, 2011)

4.5 Detecção genotípica

A presença de genes relacionados à produção pAmpC foi realizada por meio da técnica de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) multiplex, seguida por PCR simplex para todas as amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae* que foram recuperadas da pressão seletiva por cefoxitina. A inclusão dos gêneros que produzem cefalosporinases de forma intrínseca se justifica na possível aquisição de pAmpC apesar do atributo de resistência intrínseco. Em seguida foi feita a eletroforese em gel de agarose e posterior análise de resultados.

4.5.1 Obtenção do DNA bacteriano

As amostras testadas foram semeadas em uma placa de Petri (60x15mm) contendo 10 mL de CHROMagar Orientation (Difco, Michigan, EUA) e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 - 24 horas em aerobiose. Após crescimento puro, uma a duas colônias foram transferidas para um microtubo contendo 100 μL de água destilada estéril, seguida da homogeneização dessa suspensão. A obtenção do DNA foi realizada por aquecimento na primeira etapa da termociclagem da reação de PCR. Nos casos em que as suspensões não foram usadas de imediato, foi realizado o armazenamento delas no freezer a -20°C para a sua preservação e utilização futura.

4.6 Detecção dos genes codificadores de AmpC plasmidial

A detecção de bactérias produtoras de pAmpC foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foram pesquisados a presença de genes que codificam variantes de pAmpC agrupadas em 6 grupos, de acordo com a sequência de nucleotídeos, sendo eles: MOX (para detecção de *bla*_{MOX-1}, *bla*_{MOX-2}, *bla*_{CMY-1} e *bla*_{CMY-8} a *bla*_{CMY-11}), CIT (para detecção de *bla*_{LAT-1} a *bla*_{LAT-4}, *bla*_{CMY-2} a *bla*_{CMY-7} e *bla*_{BIL-1}), DHA (para detecção de *bla*_{DHA-1} e *bla*_{DHA-2}), ACC (para detecção de *bla*_{AAC}), EBC (para detecção de *bla*_{MIR-IT} e *bla*_{ACT-1}), e FOX (para detecção de *bla*_{FOX-1} a *bla*_{FOX-5b}). Após a detecção do tipo de AmpC presente nas amostras testadas, foi feita uma confirmação do resultado para cada uma dessas amostras através de PCR simplex,

específica para cada gene positivo na PCR multiplex. Os oligonucleotídeos iniciadores, as etapas de termociclagem, os alvos e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na **Tabela 1**. Para a reação, foram pipetados 10 µL de GoTaq® G2 Green Master Mix (2×) (Promega, Madison, EUA), seguidos de 0,6 µL dos oligonucleotídeos iniciadores MOX, CIT e DHA (*forward* e *reverse*; 20 pmol/µl), 0,5 µL dos oligonucleotídeos iniciadores ACC e EBC (*forward* e *reverse*; 20 pmol/µl), e 0,4 µL dos oligonucleotídeos iniciadores FOX (*forward* e *reverse*; 20 pmol/µl). Em seguida, foram adicionados 2,6 µL de H₂O livre de DNase (Uniscience) e 1 µL de DNA da amostra. Para o controle dessa reação, as amostras utilizadas foram *E. coli* PHP para o grupo CIT, e *M. morgani* para o grupo DHA. Para os grupos ACC e EBC, foram utilizadas as amostras *H. alvei* e *E. coli* c600 R96D, respectivamente. Por fim, a amostra *E. coli* 200 foi utilizada para o grupo FOX. Até o momento, não possuímos uma amostra controle correspondente ao grupo MOX (Pérez-Pérez e Hanson, 2002).

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações, os produtos amplificados foram observados por meio da eletroforese em gel de agarose (Kasvi, Espanha) a 2% em cuba horizontal. A eletroforese ocorreu a 100 volts durante 45 minutos, contendo tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X; e coloração do DNA amplificado com brometo de etídio (0,5%) (Sigma, St Louis, EUA). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o Ladder 100 pb (Sinapse, EUA) e, ao final da corrida, o gel foi revelado com auxílio de radiação ultravioleta no fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil).

4.8 Antibiograma¹

As amostras que não produzem AmpC de forma intrínseca recuperadas dos voluntários estudados, *E. coli* e *K. pneumoniae*, e que apresentaram resultado positivo ao teste presuntivo de produção de AmpC, foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Para isso, foi realizada uma suspensão em salina das amostras correspondente à turbidez 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC). Com auxílio de um *swab*, foi feita a semeadura confluenta da suspensão em uma placa de Petri (150×15mm) contendo 50 mL de ágar Mueller-Hinton (Difco, Michigan, EUA), e os discos de antimicrobianos foram distribuídos. Os discos utilizados (todos Cefar, São Paulo, Brasil) incluíram ácido nalidíxico (30µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), ertapenem

¹ O teste de detecção fenotípica da produção de AmpC e o antibiograma foram realizados na mesma placa. A divisão dos tópicos foi construída a fim de facilitar o entendimento.

(10µg), fosfomicina (50µg), gentamicina (10µg), meropenem (10µg), nitrofurantoína (300µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25µg) e tetraciclina (30µg). Vale destacar que o antimicrobiano tigeciclina (15µg) foi utilizado nesse teste no lugar de tetraciclina (30µg) para as amostras de *E.coli*, e os discos de ampicilina foram testados somente para essa espécie. Para o controle desse teste, as amostras utilizadas foram *E. coli* PHP, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Após a incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas em aerobiose, o diâmetro dos halos de inibição do crescimento formados ao redor dos discos foram medidos e as bactérias classificadas em sensível, intermediária ou resistente, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023), exceto para tigeciclina cuja interpretação foi feita com base no *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2023).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do produto, alvo e termociclagem para a detecção de genes envolvidos na produção de AmpC plasmidial

Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Tamanho do produto (pb)	Alvo	Termociclagem	Referência
MOX-F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	520	MOX/CMY-1, -8 ou -11	1. 94°C/3' 2. 25 ciclos 94°C/30" 64°C/30" 72°C/60" 3. 72°C/7'	Pérez-Pérez e Hanson. 2002
MOX-R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT				
CIT-F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	462	LAT/CMY-2 ou -7/BIL		
CIT-R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT				
DHA-F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	405	DHA		
DHA-R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG				
ACC-F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	346	ACC		
ACC-R	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC				
EBC-F	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGC	302	MIR/ACT		
EBC-R	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT				
FOX-F	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	FOX		
FOX-R	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG				

1. Denaturação inicial; **2.** 25 ciclos de: denaturação, anelamento e extensão; **3.** Extensão final; F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base.

5. RESULTADOS

5.1. Coleção bacteriana

Foram obtidos 228 *swabs* retais, oriundos de 228 indivíduos que se apresentaram no posto de pronto atendimento de um hospital público ou de um hospital privado na região metropolitana do Rio de Janeiro e que não apresentaram histórico de internação nos últimos seis meses, sendo 187 oriundos do hospital público e 41 do hospital privado. Desse total, 104 *swabs* (45,6%) apresentaram crescimento quando cultivados em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona e, após a técnica de *replica plating*, 58 (55,7%) apresentaram crescimento na placa de ágar MacConkey suplementado com ceftiofina. Dessas amostras, 231 cepas foram recuperadas, as quais foram submetidas à identificação microbiana. Os microrganismos isolados com maior frequência pertenciam às famílias *Pseudomonadaceae* (83), seguido por *Enterobacteriaceae* (82), *Hafniaceae* (21), *Moraxellaceae* (19), *Xanthomonadaceae* (9), *Alcanigenaceae* (8), *Brucellaceae* (8) e *Enterococcaceae* (1). Cinco espécies foram identificadas entre os microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, foco do presente estudo: *E. coli* (37), *Enterobacter* spp. (27), *Citrobacter* spp. (11), *K. pneumoniae* (5) e *Morganella* spp. (2). Dessas enterobactérias, as pertencentes às espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* não produzem AmpC de forma intrínseca e, portanto, constituíram a coleção de 42 cepas investigadas quanto ao fenótipo sugestivo de pAmpC (Figura 2). Essas bactérias foram oriundas de 13 (5,7%) voluntários que se apresentaram no posto de pronto atendimento do hospital público.

5.3. Triagem presuntiva da produção de pAmpC

Ao todo, 29 cepas de *E. coli*, oriundas de sete (3%) voluntários, apresentaram resistência à ceftiofina e/ou amoxicilina/ácido clavulânico; e quatro amostras de *K. pneumoniae*, oriundas de dois (0,9%) voluntários, apresentaram resistência aos mesmos antimicrobianos, representando 3,9% de prevalência do fenótipo sugestivo da produção de pAmpC na população estudada. Dessa forma, as 33 amostras que apresentaram resistência aos antimicrobianos citados seguiram para o teste de detecção do gene de AmpC plasmidial (Figura 2). As 40 cepas pertencentes às espécies que expressam cefalosporinases intrínsecas foram incluídas na pesquisa dos genes codificadores de pAmpC, para acessar a possibilidade de terem adquirido esse determinante de resistência apesar do gene cromossômico.

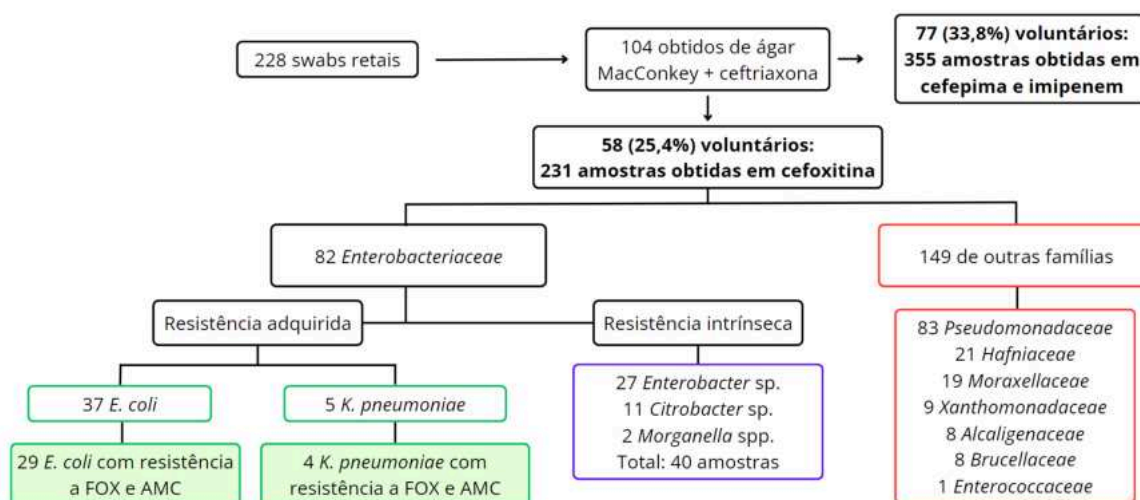


Figura 2: Fluxograma correspondente aos resultados observados a partir da coleção bacteriana até a triagem presuntiva da produção de pAmpC. Em vermelho, estão destacadas aquelas famílias que apresentam amostras pertencentes a outras famílias; em roxo, foi destacado aqueles gêneros que pertencem à família *Enterobacteriaceae* que também expressam AmpC de forma intrínseca; em verde, foram destacadas as duas espécies que não expressam AmpC intrínsecas, seguido das amostras que foram positivas no teste de triagem presuntiva da produção de pAmpC.

5.3. Teste de detecção do gene de pAmpC

Das 29 amostras de *E. coli* testadas, 23 apresentaram amplificação de algum dos grupos de pAmpC pesquisados, e os fragmentos apresentaram tamanhos compatíveis ao esperado para os genes do grupo *bla*_{CIT-like} (20) ou *bla*_{DHA-like} (3). O resultado foi confirmado por PCR simplex, como apresentado nas **figuras 3 e 4**. As demais amostras testadas, incluindo espécies identificadas como *E. coli* e *K. pneumoniae*, apresentaram resultado negativo. Para cada uma dessas amostras negativas, foi realizado testes para a detecção da presença de outros genes codificadores de enzimas betalactamases, a destacar o teste de detecção fenotípica (Jarlier *et al.*, 1988) seguido da detecção dos genes codificadores de ESBL (Botelho, 2012); e o teste mCIM (do inglês, *modified carbapenem inactivation method*) para a detecção das amostras produtoras de carbapenemase (Tsai *et al.*, 2020). Das 10 amostras testadas, quatro delas foram positivas para a presença de carbapenemase e duas para a presença de ESBL. As demais quatro amostras não apresentaram resultado positivo em nenhum dos testes realizados, tornando-se necessário mais estudos para compreender o fenótipo desses voluntários. Por fim, das 40 que expressam cefalosporinase intrínseca testadas

para a presença dos genes codificadores de pAmpC, 38 apresentaram resultado negativo e duas foram positivas para o grupo *bla*_{CIT-like}.

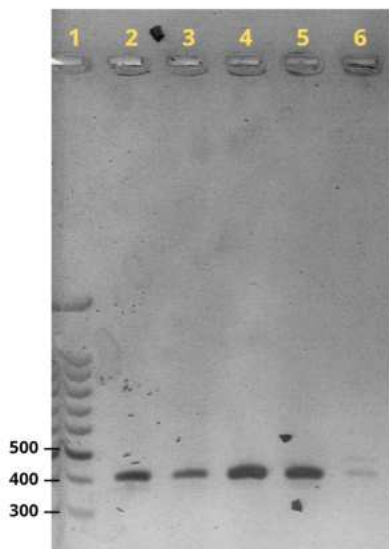


Figura 3: Gel referente a corrida eletroforética para a PCR simplex confirmatória para as amostras positivas para o gene do grupo DHA. (canaleta 1, marcador de tamanho molecular; canaleta 2, amostra ACP 353; canaleta 3, amostra ACP 362; canaleta 4, amostra ACP 369; canaleta 5, amostra controle de DHA; canaleta 6, branco)

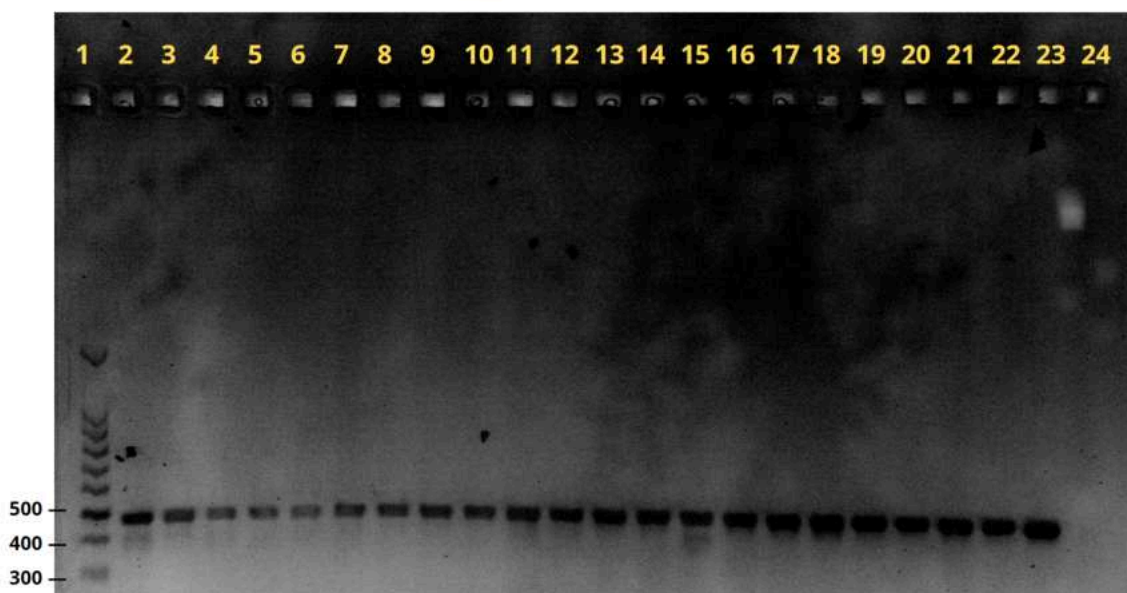


Figura 4: Gel referente a corrida eletroforética para a PCR simplex confirmatória para as amostras positivas para o gene do grupo CIT. (canaleta 1, marcador de tamanho molecular; canaleta 2, amostra CPN 131; canaleta 3, amostra CPN 132; canaleta 4, amostra CPN 133; canaleta 5 e 6, amostra CPN 134; canaleta 7, amostra ACP 156; canaleta 8, amostra ACP 157; canaleta 9, amostra ACP 158; canaleta 10, amostra ACP 159; canaleta 11, amostra ACP 222; canaleta 12, amostra ACP 223; canaleta 13, amostra ACP 224; canaleta 14, amostra ACP 225; canaleta 15, amostra ACP 226; canaleta 16, amostra ACP 227; canaleta 17, amostra ACP 296; canaleta 18, amostra ACP 297; canaleta 19, amostra ACP 300; canaleta 20, amostra ACP 301; canaleta 21, amostra ACP 306; canaleta 22, amostra ACP 319; canaleta 23, amostra controle de CIT; canaleta 24, branco).

5.4. Antibiograma e perfil de susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos

Das 33 amostras com fenótipo consistente para a produção de AmpC adquirida, 93,9% apresentaram susceptibilidade reduzida a cefoxitina e a amoxicilina/ácido clavulânico; 87,8% a cefotaxima; 84,8% a ceftriaxona; 81,8% a ciprofloxacina; 69,7% a ácido nalidíxico; 54,5% a sulfametoxazol/trimetoprim; 45,4% a gentamicina; 30,3% a aztreonam; 27,2% a ertapenem; 24,4% a cefepima; 24,2% a nitrofurantoína; 18,1% a cloranfenicol; 12,1% a fosfomicina e a meropenem; e 3% a amicacina. Todas as amostras foram suscetíveis a tigeciclina; das 29 *E. coli* testadas para ampicilina, apenas uma foi suscetível; e das quatro *K. pneumoniae* testadas para tetraciclina, duas delas foram suscetíveis e duas resistentes.

Ainda, os resultados gerados a partir do antibiograma permitiu o agrupamento das amostras em diferentes perfis de susceptibilidade, levando em consideração ainda o gene de pAmpC apresentado. Podemos observar na **tabela 2** que cada um dos 9 indivíduos apresentaram cepas com diferentes perfis. Obtivemos 20 amostras positivas para CIT com 12 perfis de susceptibilidade reduzida diferentes, três amostras de DHA apresentando três perfis diferentes e 10 amostras que não apresentaram os genes de pAmpC pesquisados que poderiam ser responsáveis pela produção do fenótipo identificado, apresentando 8 perfis diferentes. É possível notar, ainda, que alguns voluntários apresentaram cepas com perfis indistintos, como o CP158; enquanto outros apresentaram amostras com perfis diferentes, como o CP177. que apresentou quatro amostras identificadas como *E. coli*, cada uma com um perfil diferente e três delas positivas para o gene DHA. As quatro amostras pertencentes aos pacientes T3 e T23 — identificadas como *K. pneumoniae* — apresentaram quatro perfis diferentes, porém duas foram positivas para a presença dos genes codificadores de ESBL, e as outras duas não tiveram a detecção do gene responsável pela produção do fenótipo identificado. Vale destacar ainda que seis amostras pertencentes aos voluntários CP186, CP177 e T30, identificadas como *E. coli*, apresentaram quatro perfis diferentes, porém quatro foram positivas no teste de detecção do fenótipo para a presença de carbapenemase, e duas não tiveram a detecção do gene pesquisado identificado. Os resultados a respeito dos diferentes mecanismos de resistência apresentados com relação aos voluntários e os microrganismos identificados podem ser observados na **tabela 3**. Por fim, ainda é possível observar que são poucas as amostras que apresentam perfis semelhantes, a destacar as pertencentes aos perfis 2, 10, 15, 16, 20 e 22; todavia, existem muitas identificadas como pertencentes ao mesmo indivíduo que vão apresentar a mesma identificação e o mesmo gene, porém com perfis diferentes, como por exemplo o voluntário CP177 com relação os perfis 3, 6 e 1.

Tabela 2 - Perfis de resistência aos antimicrobianos testados em amostras recuperadas do TGI de indivíduos sem histórico de internação recente que apresentaram pAmpC

Perfis	AMP	AMC	FOX	CTX	CRO	CIP	NAL	SUT	GEN	ATM	ETP	CPM	NIT	CLO	FOS	MER	AMI	TET	TGC	Voluntários (N de amostras)	Espécies	Genes
1	■	■	■	■	■															CP125 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
2	■	■	■	■	■															CP125 (3)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
3	■	■	■	■	■	■														CP177 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaDHA</i>
4	■	■	■	■	■	■							■				■			CP186 (1)	<i>E. coli</i>	-
5	■	■	■	■	■	■														CP177 (1)	<i>E. coli</i>	-
6	■	■	■	■	■	■							■							CP177 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaDHA</i>
7	■	■	■	■	■	■				■		■								CP125 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
8	■	■	■	■	■	■				■		■								T18 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
9	■	■	■	■	■	■				■		■								CP125 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
10	■	■	■	■	■	■				■		■								CP061 (2)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
11	■	■	■	■	■	■				■		■								CP061 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
12	■	■	■	■	■	■				■		■								CP177 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaDHA</i>
13	■	■	■	■	■	■				■		■								CP061 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
14	■	■	■	■	■	■				■		■								T18 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
15	■	■	■	■	■	■				■		■				■				CP158 (2)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
16	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T18 (1) CP158 (4)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
17	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T23 (1)	<i>K. pneumoniae</i>	-
18	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T18 (1)	<i>E. coli</i>	<i>blaCIT</i>
19	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T3 (1)	<i>K. pneumoniae</i>	-
20	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T30 (2)	<i>E. coli</i>	-
21	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■				T23 (1)	<i>K. pneumoniae</i>	-
22	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■			■	T30 (2)	<i>E. coli</i>	-
23	■	■	■	■	■	■				■		■		■		■			■	T3 (1)	<i>K. pneumoniae</i>	-

AMP: ampicilina AMC: amoxicilina/Ácido clavulânico FOX: cefoxitina CTX: cefotaxima CRO: ceftriaxona CIP: ciprofloxacina NAL: ácido nalidíxico SUT: sulfametoxazol/Trimetoprima GEN: gentamicina ATM: aztreonam ETP: ertapenem CPM: cefepima NIT: nitrofurantoína CLO: cloranfenicol FOS: fosfomicina MER: meropenem AMI: amicacina TET: tetraciclina TGC: tigeciclina

Tabela 3 - Mecanismos de resistência à cefoxitina identificados nos microrganismos isolados e os respectivos voluntários

Voluntários	Espécie	Amostras com mecanismo de resistência à cefoxitina elucidado	Amostras com resistência à cefoxitina não elucidados	Mecanismo
T3	<i>K. pneumoniae</i>		CHN 24; CHN 26	ESBL blaTEM, blaSHV, blaCTX-M-1/2
T18	<i>E. coli</i>	CPN 131; CPN 132; CPN 133; CPN 134		blaCIT positivo
T30	<i>E. coli</i>	CHN 212; CHN 213; CHN 214; CHN 215		Carbapenemase*
CP061	<i>E. coli</i>	ACP 156; ACP 157; ACP 158; ACP 159		blaCIT positivo
CP125	<i>E. coli</i>	ACP 222; ACP 223; ACP 224; ACP 225; ACP 226; ACP 227		blaCIT positivo
CP158	<i>E. coli</i>	ACP 296; ACP 297; ACP 300; ACP 301; ACP 306; ACP 319		blaCIT positivo
CP177	<i>E. coli</i>	ACP 353; ACP 362; ACP 369		blaDHA positivo
CP177	<i>E. coli</i>		ACP 352	
CP186	<i>E. coli</i>		ACP 407	
T23	<i>K. pneumoniae</i>		CPN 165; CPN 187	

*teste fenótipo positivo

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada uma prevalência de 2,2% de enterobactérias que apresentavam o gene de pAmpC colonizando o trato gastrointestinal de indivíduos sem histórico de internação recente. Observa-se ainda uma prevalência de 3,9% do fenótipo sugestivo da produção de pAmpC na população estudada. Apesar de *K. pneumoniae* ter apresentado esse fenótipo, *E. coli* foi a única espécie que apresentou os genes pesquisados. Dentre os diferentes grupos de genes existentes, pudemos observar o CIT, em uma maior frequência, seguido de DHA. Ademais, as amostras testadas mostraram perfis de susceptibilidade reduzida a diferentes classes de antimicrobianos além dos betalactâmicos.

Durante o período de coleta, foram obtidos 228 swabs retais, e destes 104 (45,6%) apresentaram crescimento em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona. No entanto, quando replicado o crescimento dessas placas em cefoxitina, foi observado que 58 (55,7%) swabs apresentaram crescimento na vigência deste antimicrobiano. Essa diferença de presença de crescimento entre esses antimicrobianos já era esperada, visto que a ceftriaxona representa uma pressão seletiva inicial que permite tanto o crescimento de cepas produtoras de AmpC, quanto aquelas produtoras de ESBL ou carbapenemase (Queenan e Bush, 2007; Jacoby, 2009; Ghafourian *et al.*, 2015); portanto, a semeadura em uma pressão seletiva inicial e subsequente carimbo em cefoxitina foram realizadas para atuarem como um *screening* da presença de AmpC.

A identificação das espécies nos permitiu observar que 35,9% das amostras obtidas na vigência de cefoxitina eram pertencentes à família *Pseudomonadaceae*. Isso pode ser explicado pela capacidade desses microrganismos apresentarem resistência intrínseca mediada pela combinação de impermeabilidade; produção de dois genes codificadores de betalactamases — *bla*_{OXA-50} e AmpC induzível — e a presença de dois sistemas de efluxo continuamente expressos (Lupo, Haenni e Madec, 2018). Já na família *Hafniaceae*, que representou 9% dessas amostras, estão presentes microrganismos que podem ser encontrados nos seres humanos, assim como em esgoto, solo e água (Ionescu *et al.*, 2022), e esses microrganismos podem produzir cefalosporinase em baixo nível de forma induzível ou em alto nível de forma constitutiva. Isso porque o produto do gene *ampR*, localizado próximo ao gene codificador de AmpC, pode atuar como ativador da biossíntese de AmpC após a adição de um indutor betalactâmico (Girlich, 2000). A família *Moraxellaceae* representou 8,2% das amostras obtidas e, dentre os seus mecanismos intrínsecos, tem-se a impermeabilidade natural da membrana, efluxo basal e betalactamases cujos genes estão localizados no cromossomo,

como a oxacilinase OXA-51 e a enzima AmpC (Corvec *et al.*, 2003; Lupo, Haenni e Madec, 2018). Com 3,8% de amostras obtidas, a família *Xanthomonadaceae* apresenta espécies com diferentes mecanismos que contribuem para a sua resistência aos antimicrobianos, dentre elas, a *Stenotrophomonas maltophilia* pode apresentar bombas de efluxo, betalactamases codificadas nos cromossomos, plasmídeos e transposon e, assim como na família *Hafniaceae*, a presença do regulador transcricional *ampR* capaz de regular — ativando ou reprimindo — a expressão de AmpC (Brooke, 2012). As famílias *Alcaligenaceae* e *Brucellaceae*, representaram 3,4% do total, e apresentam microrganismos como *Achromobacter*, que tem como principais mecanismos de resistência intrínseca as bombas de efluxo e betalactamases cromossômicas como OXA-114 e AmpC, que também podem ser adquiridas (Isler *et al.*, 2020; Fluit *et al.*, 2022), e como *Ochrobactrum*, que frequentemente não respondem a terapia empírica padrão devido à produção de AmpC (ElAdawy *et al.*, 2012). Por fim, representando 0,43% das amostras obtidas, a família *Enterococcaceae*, que apresenta patógenos oportunistas tipicamente presentes na microbiota intestinal, e que podem adquirir resistência por meio de plasmídeos ou transposons, ou então apresentar resistência intrínseca às cefalosporinas, o que os tornam importantes quando se trata de infecções adquiridas na comunidade (Torres *et al.*, 2018).

Com relação à família *Enterobacteriaceae*, dois casos podem ser observados: o de ocorrência de espécies sabidamente produtoras de AmpC intrínsecas, e de espécies onde a expressão fenotípica da resistência à cefoxitina não é uma característica intrínseca. Entre os produtores de AmpC cromossômicas, os gêneros isolados no nosso estudo incluiu *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Morganella*. *Enterobacter* sp. é um organismo de relevante potencial patogênico causador de IRAS, que com frequência apresentam resistência a carbapenemas devido à hiperexpressão do gene AmpC juntamente com alterações na permeabilidade da membrana, e também pela aquisição de genes para carbapenemases, por exemplo, através de plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis (Mezzatesta, Gona e Stefani, 2012; Boyd *et al.*, 2020). *Citrobacter* sp. é outro gênero também comum em amostras de origem nosocomial, muito documentada em episódios de colonização e IRAS, sobretudo em pacientes internados em UTIs (Anderson *et al.*, 2018). O gênero expressa AmpC de forma constitutiva e hiperexpressa de forma induzível. Pode adquirir ESBLs, carbapenemases, oxacilinases e também determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos mediadas por plasmídeos (Liu *et al.*, 2018). Por fim, o gênero *Morganella* sp. também é um organismo capaz de causar infecções, comum no ambiente nosocomial e que apresenta AmpC induzível. Pode estar associado a infecções na corrente sanguínea e do trato urinário,

sobretudo em pacientes imunocomprometidos (Liu *et al.*, 2016). Esses microrganismos apresentam um grande impacto clínico uma vez que existem diversos fatores que corroboram isso, como uma intensa transmissão cruzada de microrganismos nos hospitais, sistemas de saúde ineficazes, saneamento deficiente, e economia dependente de agricultura e pecuária, na qual utilizam grandes quantidades de antimicrobianos, o que pode acarretar em animais, solo e água colonizados por bactérias resistentes aos antimicrobianos, que foram selecionadas por pressão seletiva antropogênica (Bonelli, Moreira e Picão, 2014).

Entre os microrganismos que podem apresentar AmpC de forma adquirida em indivíduos na comunidade, foco deste trabalho, observamos *E. coli* (3%) com maior frequência, seguido por *K. pneumoniae* (0,9%). *E. coli* é uma das causas mais frequentes de diversas infecções bacterianas em seres humanos, como enterite, ITUs, septicemia e meningite neonatal (Allocati *et al.*, 2013), e que pode apresentar, dentre diferentes mecanismos de resistência, as pAmpC. Como exemplo, o gene *bla*_{CMY-2} (do grupo CIT) já foi descrito nessa espécie recuperada de aves, carnes bovinas e suínas, amostras ambientais e em humanos (Voets *et al.*, 2013). *K. pneumoniae* é outra espécie com uma crescente notoriedade devido à sua propensão em acumular mutações e adquirir determinantes genéticos que levam ao surgimento de múltiplos clones de relevância internacional e resistentes a diferentes classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, quinolonas, tigeciclina, polimixinas e betalactâmicos (Dong *et al.*, 2022). Esses dois microrganismos são a causa comum de infecções hospitalares e comunitárias, e podem apresentar enzimas do tipo ESBL, AmpC e carbapenemases (Kazemian *et al.*, 2019). Apesar disso, a diferença observada com relação a presença de *E. coli* (87,9%) e *K. pneumoniae* (12,1%) no teste de detecção do fenótipo também pode ser observada em outros estudos. Em Taiwan, de 50 enterobactérias fenotipicamente positivas para AmpC isoladas de pacientes com ITU, 60% eram *E. coli* e 8% eram *K. pneumoniae* (Lee *et al.*, 2015). Já um estudo na Uganda isolou 129 enterobactérias produtoras de AmpC de indivíduos que frequentavam ambulatórios na área rural e urbana, nos quais 89,9% eram *E. coli* e 10,1% eram *K. pneumoniae* (Najjuka *et al.*, 2020). Ao observar estudos como esses, podemos considerar que a frequência de *E. coli* observada no presente estudo já era esperada, visto que é bastante similar ao encontrado na literatura.

Ao realizar o teste de detecção do gene responsável pelo fenótipo compatível com a produção de AmpC, foi observada a presença de 8,6% amostras positivas para o grupo CIT com relação às amostras recuperadas da pressão seletiva por cefoxitina, um resultado muito similar ao encontrado na literatura, onde observa-se que a rápida disseminação de plasmídeos como o IncA/C ou Inc11, portadores do gene *bla*_{CMY-2} mais frequentemente relatados, é

responsável pela ampla distribuição desse gene entre as *Enterobacteriaceae* (Fang *et al.*, 2015; Fallah *et al.*, 2020). É possível encontrar estudos de diferentes lugares e diferentes compartimentos ambientais que identificaram a presença de pAmpC positivas para o gene *bla*_{CMY-2}, como em cães e gatos no Taiwan (Liu, Kuan, Yeh, 2021), carcaças de frango congeladas (Botelho *et al.*, 2015), viajantes (Tufic-Garutti *et al.*, 2021) e pacientes ambulatoriais e internados (Sampaio e Gales, 2016) no Brasil, e em indivíduos da comunidade na Holanda (Reuland *et al.*, 2015). Nota-se ainda a presença de 1,2% de amostras positivas para o grupo *bla*_{DHA-like} que, assim como indicado na literatura, se mostraram isoladas em menor quantidade (Giakkoupi *et al.*, 2006). Esse gene já observado em indivíduos hospitalizados (Mohamudha, Harish e Parija, 2012; Lee *et al.*, 2015; Aryal *et al.*, 2020) pode ser co-expresso com diversos outros genes de resistência a antimicrobianos, como por exemplo ESBL, oxacilinas, penicilinas, carbapenemas, aminoglicosídeos e genes que codificam resistência à sulfonamidas (Hennequin, Ravet e Robin, 2018). Ademais, os plasmídeos que transportam o gene *bla*_{DHA-1} também podem carregar o gene *ampR*, tornando essa betalactamase induzível naqueles que adquirem esses elementos (Akata *et al.*, 2019). Todavia, não se observam estudos para a detecção de pAmpC que descrevem a presença dessa enzima no Brasil, independente da esfera ambiental estudada, o que pode ser explicado pela presença do gene repressor, no qual pode interferir inibindo a expressão dessa enzima. Os resultados apresentados refletem a parcela de disseminação encontrada na comunidade, que pode servir como porta de entrada para bactérias portadoras dessa enzima em hospitais, águas residuais, agricultura e animais, sejam domésticos ou de criação.

Durante o teste de detecção do gene, apresentamos ainda 10 amostras no qual o gene pesquisado responsável pela produção do fenótipo não foi detectado. Para explicar o crescimento obtido com os discos dispostos, realizamos o teste que nos permitiu avaliar a produção de carbapenemase, o mCIM, no qual foi observado que quatro amostras — CHN 212, CHN 213, CHN 214 e CHN 215 — identificadas como *E.coli*, foram positivas para a presença de carbapenemase. É possível ainda que sejam encontradas cepas que apresentem pAmpC capazes de sofrerem mutações, e se tornarem resistentes aos carbapenêmicos quando associados a perda de porinas ou ativação da bomba de efluxo (Jacoby, 2009; Rensing *et al.*, 2019; Bush e Bradford, 2020), assim como pode ocorrer a produção de carbapenemase, codificadas em cromossomos e plasmídeos (Bush, 2018), que conferem resistência a esses betalactâmicos. Sendo assim, casos relacionados à presença de pAmpC são consideráveis se essas amostras apresentarem algum gene pertencente a essa família no qual não seja possível identificar. Ademais, essa resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e cefoxitina pode ser

explicada pela possível mutação ou modulação da expressão de genes intrínsecos, como já abordado, assim como pela presença de uma betalactamase diferente da de interesse do estudo, a carbapenemase.

A fim de tentar explicar o resultado de outras duas amostras negativas, acrescentamos ao teste de detecção do fenótipo, os discos que nos permitem detectar presuntivamente a presença de ESBL, sendo eles aztreonam (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefoxitina (30 µg) e cefepima (30 µg). Ao observar a presença de uma zona fantasma de inibição ou distorções no padrão de crescimento bacteriano na interseção entre os discos testados e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico, concluímos que essas amostras, identificadas como *K.pneumoniae*, eram possíveis produtoras de ESBL (Jarlier *et al.*, 1988) e, ao realizar a PCR para confirmação e detecção do gene, observamos que as duas amostras — CHN 24 e CHN 26 — oriundas do mesmo indivíduo, foram positivas para SHV, TEM e CTX-M-1/2. As demais quatro amostras, identificadas como duas *E. coli* e duas *K. pneumoniae*, não foram positivas para nenhum dos testes, sendo necessários experimentos adicionais para identificar o mecanismo de resistência apresentado, que pode ser explicado, por exemplo, pela perda de porina ou hiperexpressão de bombas de efluxo, quando exposta a uma determinada pressão seletiva, ou mesmo pela presença de um gene novo de pAmpC que não foi pesquisado nessa oportunidade.

Importante destacar que o teste de detecção dos genes foi realizado também para as amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae* que apresentavam AmpC intrínseca, uma vez que as mesmas também podem receber genes codificadores dessas enzimas através de plasmídeos. Essa detecção é possível desde que o gene de pAmpC não seja do mesmo grupo que a AmpC cromossômica (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). Das 40 amostras testadas, 38 apresentaram resultado negativo, sugerindo que esse grupo de microrganismos não participa de forma relevante da disseminação de pAmpC no TGI da população estudada. Ademais, duas amostras identificadas como *C. freundii*, pertencentes ao voluntário T16, foram positivas para o grupo CIT. Embora essa espécie seja conhecida por abrigar um gene intrínseco do grupo CIT, a amplificação observada não é esperada, pois, segundo os autores do artigo que desenvolveu a PCR multiplex para a detecção de pAmpC, os iniciadores não hibridizam nos genes que codificam as AmpCs cromossômicas de *C. freundii*. Assim, esses achados podem significar a presença de uma possível AmpC cromossômica mutada, ou um uma pAmpC presente além da cromossômica. Todavia, estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

Foi observado se a prevalência de pAmpC na comunidade poderia ter uma influência regional. Identificou-se no atual estudo que, do total de 228 voluntários oriundos da comunidade, a prevalência de *E. coli* positiva para pAmpC foi de 2,2%. Em um estudo realizado em Amsterdã (2015), na Holanda, obteve um total de 1,3% de *E. coli* positivas para pAmpC, oriundas de amostras fecais de voluntários recrutados da comunidade (Reuland *et al.*, 2015). Apesar desses países apresentarem uma notória diferença socioeconômica e sistemas de saneamento básico e tratamento de esgotos diferentes (Souza e Santos, 2016), uma melhor qualidade de vida não reflete uma prevalência desproporcional de bactérias portadoras de pAmpC. Pode-se levar em consideração que, quando se trata de esgoto, o tratamento é capaz de reduzir as concentrações de alguns, porém não todos, antimicrobianos e microrganismos e, sendo assim, mesmo com o tratamento não existe uma eliminação completa desse problema. Observa-se também que, enquanto nos países desenvolvidos com tratamento de esgoto e água potável adequados a transmissão se dá, em sua maioria, por meio de alimentos, em países com tratamento de esgoto e água inadequados, a água considerada potável é uma provável fonte de transmissão dessas bactérias e genes de resistência (McEwen e Collignon, 2018). Dessa forma, é notório que, quando se trata de regiões diferentes, diversos fatores podem estar associados a aquisição desses microrganismos, o que pode explicar os resultados semelhantes.

Quando analisado o período de coleta das amostras, observa-se que a prevalência não apresentou uma grande influência do período pandêmico. Em um estudo realizado por Tufic-Garutti e colaboradores, no Brasil, foi observado uma prevalência de 2% de pAmpC em indivíduos pré viagem, no período de 2015 a 2019 (Tufic-Garutti *et al.*, 2021). Por outro lado, o presente estudo trabalhou com amostras coletadas no período de novembro de 2021 a dezembro de 2022, e apresentou uma prevalência de apenas 0,2% maior do que o estudo anteriormente citado. Por mais que, com a pandemia de COVID-19, tenha sido observado um aumento no número de embalagens contendo antibióticos vendidos, a destacar amoxicilina, azitromicina e cefalexina (Del Fiol *et al.*, 2022; Massarine *et al.*, 2023), a prevalência de pAmpC não apresentou um aumento significativo. Todavia, um estudo realizado na Itália coletou amostras de pacientes admitidos no hospital no período de agosto de 2019 a março de 2021, e observou um aumento de 9% para 11,5% de *E. coli* produtora de ESBL no período pré e pós pandemia, respectivamente (Shbaklo *et al.*, 2022), mostrando que esse período pode ter apresentado um papel relevante no desenvolvimento de microrganismos resistentes que apresentavam essa enzima. O aumento na prevalência de ESBL com relação a pAmpC no período pós pandemia pode ser explicado pela pAmpC ainda ser uma betalactamase rara, encontrada em menos de 1% dos isolados de *E. coli* uropatogênica de infecções associadas a

comunidade no Brail (de Pinho Rodrigues *et al.*, 2022), diferente da ESBL no qual o gene CTX-M vai ser bastante descrito, inclusive em ambientes hospitalares e comunitários no Brasil (Rocha, Pinto e Barbosa, 2016).

O teste de susceptibilidade realizado para as amostras com fenótipo positivo utilizou para a análise dos pontos de corte o CLSI. O mesmo foi selecionado no lugar do BrCAST visto que ele é mais aceito internacionalmente, apesar do BrCAST levar em consideração critérios para antimicrobianos altamente em uso no Brasil. Dentre as diferenças observadas entre as duas organizações, é possível encontrar discos com concentrações diferentes, assim como a classificação que, no BrCAST, se observa, para a maioria dos discos testados, sensível e resistente para a *Enterobacterales*, enquanto no CLSI dispõe ainda da classificação intermediária. Sendo assim, ao realizar uma breve comparação entre os antimicrobianos que apresentam a mesma concentração, é possível observar a alteração da classificação em alguns discos utilizados, como cefoxitina, aztreonam, meropenem e sulfametoxazol/trimetoprima. Existem ainda discos que não apresentam pontos de corte no CLSI, como cloranfenicol e tigeciclina, e no BrCAST, como tetraciclina. Ademais, o disco de tetraciclina foi substituído pelo de tigeciclina para as amostras identificadas como *E. coli*, uma vez que o mesmo é mais utilizado na clínica, tornando possível a observação de um resultado mais compatível com os antimicrobianos utilizados pela comunidade.

Ao analisar os perfis de susceptibilidade que foram formados após a realização do antibiograma, é possível notar voluntários que apresentam bactérias com perfis distintos mas que carregam o mesmo gene codificador de pAmpC. Isso pode nos indicar que esses indivíduos podem ser colonizados por uma ou mais cepas carreadoras desses genes, o que talvez signifique a disseminação do mesmo plasmídeo entre diferentes bactérias. Entretanto, a tipificação das amostras e o estudo detalhado dos plasmídeos por elas carregadas são necessários para compreender o fenômeno observado nesses voluntários.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Uma das amostras com crescimento em cefoxitina não foi possível identificar porque outra cepa crescia junto a ela, impedindo de realizar o seu isolamento. Isso pode ser explicado por uma provável relação de mutualismo, no qual os microrganismos se associam e se beneficiam um do outro para poderem sobreviver (Bascompte, 2019). Já o seu crescimento na pressão seletiva, pode ter ocorrido devido a possível mutação ou modulação da expressão de genes intrínsecos, ou pela presença de alguma betalactamase que confere resistência na qual, sem o isolamento, não é possível realizar testes que afirmam essa hipótese, pois não se sabe qual dos microrganismos é capaz de expressar tal enzima.

Os amplicons das amostras positivas para o grupo CIT não puderam ser enviados para sequenciamento e, por esse motivo, nosso resultado se limitou apenas ao grupo, o que nos impede de identificar se o gene de pAmpC é *bla*_{CMY} ou *bla*_{LAT}. Em nosso laboratório, não possuímos amostra controle de MOX, um dos grupos de pAmpC que apresenta os genes *bla*_{MOX} e algumas variantes de *bla*_{CMY}, todavia, a PCR foi realizada mas nenhuma amostra positiva foi detectada nas condições utilizadas. Para esse grupo, a análise ocorreria pelo tamanho do amplicon e, caso alguma amostra fosse positiva, seria necessário realizar o sequenciamento.

O projeto recebeu amostras de um hospital público e um hospital privado para a realização dos testes e observou-se que as amostras fenotipicamente positivas para AmpC neste trabalho foram todas oriundas de um hospital público. Vale destacar que nós recebemos mais amostras do hospital público do que o privado, e isso pode ser devido ao hospital público ter sido mais solícito com relação a doação de amostras quando comparado ao privado. Porém, essa diferença pode atrapalhar a análise dos resultados que teria por objetivo comparar a condição socioeconômica dos indivíduos com os resultados apresentados. Nos perfis de susceptibilidade identificados, observa-se que temos microorganismos com a mesma identificação, oriundos do mesmo indivíduo, com o mesmo gene de pAmpC, porém com perfis diferentes, nos levando a considerar essas amostras diferentes umas das outras. Entretanto, existem amostras oriundas do mesmo voluntário que foram agrupadas e apresentam perfis semelhantes, o que podemos interpretar como possíveis clones. Todavia, são necessários testes capazes de detectar esses clones para a confirmação dessa hipótese.

Por fim, a obtenção de fezes por indivíduos que se apresentaram no posto de pronto atendimento do hospital pode ser mais difícil, pois, tratando-se de um ambiente onde os indivíduos se apresentam em um estado mais vulnerável, os *swabs* retais são mais convenientes de coletar e a coleta pode ser feita com instruções mínimas (Bassis *et al.*, 2017). Muitos poderiam não aceitar coletar uma amostra, assim seria necessário esperar o tempo de evacuação de cada um, o que demandaria mais tempo e dificultaria a adesão dos voluntários ao estudo, assim como poderia interferir na quantidade de amostras de estudo. Além disso, os *swabs* são mais facilmente transportados do que amostras fecais, que requer maiores cuidados que poderiam não ser alcançados, o que prejudicaria o nosso projeto. Assim, acreditamos que a utilização dos *swabs* retais tornou o nosso projeto viável.

Esse estudo ressalta a necessidade constante de avaliar os perfis de susceptibilidade reduzida das amostras produtoras de pAmpC a diferentes classes de antimicrobianos em indivíduos oriundos da comunidade. Dentre os genes identificados nas cepas com perfil

sugestivo de pAmpC, observamos a ocorrência de variantes mais presentes na literatura; porém 30% das amostras com o fenótipo sugestivo não apresentaram amplificação de gene. Isso nos leva a acreditar que possam existir mecanismos diferentes que promovam a resistência e que podem estar presentes nestas bactérias e serem expressos quando submetidos a determinada pressão seletiva, assim como podem ter sido adquiridos por meio de elementos genéticos móveis. Observar ainda uma menor sensibilidade em diferentes classes de antimicrobianos mostra que a resistência se dissemina pela comunidade, mesmo que de maneira discreta. A avaliação contínua dessas ocorrências é de fundamental importância, especialmente entre indivíduos mais vulneráveis, pois pode significar maior restrição na escolha do tratamento em eventuais infecções por esses organismos.

7. CONCLUSÕES

- Aproximadamente 4% dos indivíduos que se apresentaram no posto de pronto atendimento e não apresentavam histórico de hospitalização recente apresentaram *E. coli* ou *K. pneumoniae* com fenótipo sugestivo da produção de AmpC.
- A prevalência do gene de pAmpC em voluntários oriundos da comunidade que buscam pronto atendimento foi de 2,2%, ressaltando a necessidade de medidas e ações mitigadoras da resistência, a fim evitar um aumento cada vez maior na prevalência.
- Os grupos CIT e DHA foram os genes de pAmpC encontrados em *E.coli* que colonizaram indivíduos da comunidade.
- Os determinantes da resistência a cefoxitina observada nas amostras de *K. pneumoniae* carecem de elucidação por outros estudos
- Observamos uma variedade de perfis no antibiograma entre as amostras de *E. coli* que apresentaram os genes codificadores de enzimas dos grupos CIT e DHA, e entre aquelas cujo mecanismo de resistência não foi identificado; ressaltando, nestes grupos, grande frequência de resistência a quinolonas, sulfametoxazol/trimetoprima e aminoglicosídeos. Isso mostrou que os indivíduos podem portar microrganismos capazes de resistir a diferentes classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento das infecções causadas por eles, promovendo falha terapêutica em eventuais futuras infecções por esses microrganismos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akata, K., Muratani, T., Yatera, K., Naito, K., Noguchi, S., Yamasaki, K., Kawanami, T., Kido, T., & Mukae, H. (2019). Induction of plasmid-mediated AmpC β -lactamase DHA-1 by piperacillin/tazobactam and other β -lactams in Enterobacteriaceae. *PloS one*, 14(7), e0218589.
- Al-Agamy, M. H., El Mahdy, T. S., & Shibl, A. M. (2016). Fecal Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase and AmpC-Producing *Escherichia coli*. *BioMed research international*, 2016, 3704150.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235–6254.
- Anderson, M. T., Mitchell, L. A., Zhao, L., & Mobley, H. L. T. (2018). *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. *Scientific reports*, 8(1), 11792.
- Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655.
- Aryal, S. C., Upreti, M. K., Sah, A. K., Ansari, M., Nepal, K., Dhungel, B., Adhikari, N., Lekhak, B., & Rijal, K. R. (2020). Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase CITM and DHAM Genes Among Gram-Negative Clinical Isolates. *Infection and drug resistance*, 13, 4249–4261.
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in biochemistry*, 61(1), 49–59.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 771510.
- Bascompte J. (2019). Mutualism and biodiversity. *Current biology : CB*, 29(11), R467–R470.
- Bassis, C. M., Moore, N. M., Lolans, K., Seekatz, A. M., Weinstein, R. A., Young, V. B., Hayden, M. K., & CDC Prevention Epicenters Program (2017). Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles. *BMC microbiology*, 17(1), 78.
- Berkner, S., Konradi, S., & Schönfeld, J. (2014). Antibiotic resistance and the environment--there and back again: Science & Society series on Science and Drugs. *EMBO reports*, 15(7), 740–744.
- Bonelli, R. R., Moreira, B. M., & Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 17(1-2), 24–36.
- Börjesson, S., Ny, S., Egervärn, M., Bergström, J., Rosengren, Å., Englund, S., Löfmark, S., & Byfors, S. (2016). Limited Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase- and Plasmid-Encoded AmpC-Producing *Escherichia coli* from Food and Farm Animals, Sweden. *Emerging infectious diseases*, 22(4), 634–640.
- Botelho, L. A. B. (2012) Perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de beta-lactamases em amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango congelado comercializado no estado do Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 80f.
- Botelho, L. A., Kraychete, G. B., Costa e Silva, J. L., Regis, D. V., Picão, R. C., Moreira, B. M., & Bonelli, R. R. (2015). Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 249–254.

- Bouet, J. Y., & Funnell, B. E. (2019). Plasmid Localization and Partition in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2019.
- Boyd, D. A., Lefebvre, B., Mataseje, L. F., Gagnon, S., Roger, M., Savard, P., Longtin, J., & Mulvey, M. R. (2020). Enterobacter sp. N18-03635 harbouring blaFRI-6 class A carbapenemase, Canada. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(2), 486–488.
- Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J., & Bush, K. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3), 563–569.
- Brenner, D. J. (1983). Opposition to the Proposal to Replace the Family Name Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 892–895.
- Briaud, P., & Carroll, R. K. (2020). Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infection and immunity*, 88(12), e00433-20.
- Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A., & Nelson, K. E. (2017). The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microbial ecology*, 74(4), 1001–1008.
- Brooke J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2–41.
- Bush K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10), e01076-18.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(2), e00047-19.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211–1233.
- CD59/INF/10 - Plano de ação para a resistência antimicrobiana: Relatório final - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. (2021). Obtido de <https://www.paho.org/pt/documentos/cd59inf10-plano-acao-para-resistencia-antimicrobiana-relatorio-final>
- CDC (2019) Centers For Disease Control And Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 140
- CDC. (2018). One Health Basics. Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. (2019). Antibiotic / Antimicrobial Resistance. Centers for Disease Control and Prevention.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one*, 6(3), e17549.
- Corrêa, J. S., Zago, L. F., Silva-Brandão, R. R. D., Oliveira, S. M., Fracoli, L. A., Padoveze, M. C., & Curra, G. C. C. (2022). Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. *Revista da Escola de Enfermagem da U S P*, 56, e20210589.

- Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H., & Reynaud, A. (2003). AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(4), 629–635.
- de Pinho Rodrigues, K. M., de Rezende, D. F., Pinto, M. P., Dos Santos Tufic-Garutti, S., Ramalho, J. V. A., de Araújo Longo, L. G., de Carvalho Girão, V. B., de Oliveira, G. C., Vilar, L. C., & Moreira, B. M. (2022). High levels of gut carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in community settings in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 53(1), 205–212.
- Del Fiol, F. S., Bergamaschi, C. C., De Andrade, I. P., Jr, Lopes, L. C., Silva, M. T., & Barberato-Filho, S. (2022). Consumption Trends of Antibiotics in Brazil During the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in pharmacology*, 13, 844818.
- Demo, M. L. O., Orth, L. C., & Marcon, C. E. M. (2019). Brazil's health-care system. *The Lancet*, 394(10213), 1992.
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 79, 103998.
- Duncan, P., Bertolozzi, M. R., Cowley, S., Egry, E. Y., Chiesa, A. M., & de Siqueira França, F. O. (2015). "Health for All" in England and Brazil?. *International journal of health services : planning, administration, evaluation*, 45(3), 545–563.
- ElAdawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., & Hafez, H. M. (2012). Isolation and characterization of *Ochrobactrum anthropi* and *Ochrobactrum pecoris* from caecal content of commercial turkeys. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 349–354.
- Enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas de transplantados renais: frequência e perfil de resistência - 48n.2. (n.d.). *Revista RBAC*.
<https://www.rbac.org.br/artigos/enterobacterias-produtoras-de-beta-lactamase-de-espectro-ampliado-esbl-em-uroculturas-de-transplantados-renais-frequencia-e-perfil-de-resistencia-48n-2/>
- Ewing, W. H., Farmer, J. J., & Brenner, D. J. (1980). Proposal of Enterobacteriaceae fam. nov., nom. rev. to Replace Enterobacteriaceae Rahn 1937, nom. fam. cons. (Opin. 15, Jud. Comm. 1958), Which Lost Standing in Nomenclature on 1 January 1980. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(4), 674–675.
- Faghihi, K., Tajbakhsh, S., Fouladvand, M., Latifi, B., & Yousefi, F. (2023). Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Bushehr province, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 15(3), 373–382.
- Fallah, F., Azimi, T., Azimi, L., Karimi, A., Rahbar, M., Shirdoust, M., Sedighi, I., Saadat Sadeghi, A., & Armin, S. (2020). Evaluating the antimicrobial resistance and frequency of AmpC β -lactamases blaCMY-2 gene in Gram-negative bacteria isolates collected from selected hospitals of Iran: A multicenter retrospective study. *Gene Reports*, 21, 100868.
- Fang, L. X., Sun, J., Li, L., Deng, H., Huang, T., Yang, Q. E., Li, X., Chen, M. Y., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2015). Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. *International journal of antimicrobial agents*, 46(2), 209–213.
- Fluit, A. C., Bayjanov, J. R., Aguilar, M. D., Benaissa-Trouw, B., Tunney, M. M., Westreenen, M. V., Meis, J. F., Elborn, J. S., Cantón, R., & Ekkelenkamp, M. B. (2022). Taxonomic position, antibiotic resistance and virulence factors of clinical *Achromobacter* isolates. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 14(2), 9.
- Gacesa, R., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Sinha, T., Klaassen, M. A. Y., Bolte, L. A., Andreu-Sánchez, S., Chen, L., Collij, V., Hu, S., Dekens, J. A. M., Lenters, V. C., Björk, J. R., Swarte, J. C., Swertz, M. A., Jansen, B.

- H., Gelderloos-Arends, J., Jankipersadsing, S., Hofker, M., Vermeulen, R. C. H., ... Weersma, R. K. (2022). Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature*, 604(7907), 732–739.
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current issues in molecular biology*, 17, 11–21.
- Giakkoupi, P., Tambic-Andrasevic, A., Vourli, S., Skrlin, J., Sestan-Crnek, S., Tzouvelekis, L. S., & Vatopoulos, A. C. (2006). Transferable DHA-1 cephalosporinase in *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, 27(1), 77–80.
- Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(11), 3220–3223.
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Van Tyne, D. (2021). Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infection and immunity*, 89(4), e00693-20.
- Govindaswamy, A., Bajpai, V., Khurana, S., Aravinda, A., Batra, P., Malhotra, R., & Mathur, P. (2019). Prevalence and characterization of beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from a tertiary care hospital in India. *Journal of laboratory physicians*, 11(2), 123–127.
- Gujarati, S., Chaudhari, D., Hagir, A., Khairnar, M., Shouche, Y., & Rahi, P. (2020). *Klebsiella indica* sp. nov., isolated from the surface of a tomato. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(5), 3278–3286.
- Gupta, G., Tak, V., & Mathur, P. (2014). Detection of AmpC β Lactamases in Gram-negative Bacteria. *Journal of laboratory physicians*, 6(1), 1–6.
- Hennequin, C., Ravet, V., & Robin, F. (2018). Plasmids carrying DHA-1 β -lactamases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 37(7), 1197–1209.
- Howard, J. C., Creighton, J., Ikram, R., & Werno, A. M. (2020). Comparison of the performance of three variations of the Carbapenem Inactivation Method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing Enterobacterales and non-fermenters. *Journal of global antimicrobial resistance*, 21, 78–82.
- Huang, Y. S., Lai, L. C., Chen, Y. A., Lin, K. Y., Chou, Y. H., Chen, H. C., Wang, S. S., Wang, J. T., & Chang, S. C. (2020). Colonization With Multidrug-Resistant Organisms Among Healthy Adults in the Community Setting: Prevalence, Risk Factors, and Composition of Gut Microbiome. *Frontiers in microbiology*, 11, 1402.
- Ionescu, M. I., Neagoe, D. Ş., Crăciun, A. M., & Moldovan, O. T. (2022). The Gram-Negative Bacilli Isolated from Caves-*Sphingomonas paucimobilis* and *Hafnia alvei* and a Review of Their Involvement in Human Infections. *International journal of environmental research and public health*, 19(4), 2324.
- Isler, B., Kidd, T. J., Stewart, A. G., Harris, P., & Paterson, D. L. (2020). *Achromobacter* Infections and Treatment Options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(11), e01025-20.
- Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182.
- Janaina Manguiera de Arruda, C., Felix de Almeida Siqueira, V., Junior Manguiera de Souza, F., a Laís das Neves Silva, J., y Ferreira dos Santos, K., Zacarias Cipriano, D., Adriana de Souza Dias, L., & R. A. Faro, F. (2019). 11. https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/10/085_Revis%C3%A3o-bibliogr%C3%A1fica-de-antibi%C3%B3ticos-beta-lact%C3%A2micos-982-a-995.pdf

- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of infectious diseases*, 10(4), 867–878.
- Jazmati, T., Hamprecht, A., & Jazmati, N. (2021). Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales (3GCREB). *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 40(11), 2431–2436.
- Johnson J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews*, 4(1), 80–128.
- Jung, B., & Hoilat, G. J. (2022). MacConkey Medium. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kazemian, H., Heidari, H., Ghanavati, R., Ghafourian, S., Yazdani, F., Sadeghifard, N., Valadbeigi, H., Maleki, A., & Pakzad, I. (2019). Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Medical principles and practice* : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre, 28(6), 547–551.
- Korpela, K., & de Vos, W. M. (2018). Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Current opinion in microbiology*, 44, 70–78.
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, 64, 163–184.
- Lee, C. H., Lee, Y. T., Kung, C. H., Ku, W. W., Kuo, S. C., Chen, T. L., & Fung, C. P. (2015). Risk factors of community-onset urinary tract infections caused by plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 48(3), 269–275.
- Liu, F. L., Kuan, N. L., & Yeh, K. S. (2021). Presence of the Extended-Spectrum- β -Lactamase and Plasmid-Mediated AmpC-Encoding Genes in *Escherichia coli* from Companion Animals-A Study from a University-Based Veterinary Hospital in Taipei, Taiwan. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1536.
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International journal of infectious diseases* : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 50, 10–17.
- Liu, L. H., Wang, N. Y., Wu, A. Y., Lin, C. C., Lee, C. M., & Liu, C. P. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 51(4), 565–572.
- Livermore, D. M., Brown, D. F., Quinn, J. P., Carmeli, Y., Paterson, D. L., & Yu, V. L. (2004). Should third-generation cephalosporins be avoided against AmpC-inducible Enterobacteriaceae?. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10(1), 84–85.
- Luan, Y., Li, G. L., Duo, L. B., Wang, W. P., Wang, C. Y., Zhang, H. G., He, F., He, X., Chen, S. J., & Luo, D. T. (2015). DHA-1 plasmid-mediated AmpC β -lactamase expression and regulation of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Molecular medicine reports*, 11(4), 3069–3077.
- Lupo, A., Haenni, M., & Madec, J. Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology spectrum*, 6(3), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017.
- Madec, J. Y., Haenni, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans?. *Clinical microbiology and*

infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23(11), 826–833.

Marino, A., Munafò, A., Zagami, A., Ceccarelli, M., Di Mauro, R., Cantarella, G., Bernardini, R., Nunnari, G., & Cacopardo, B. (2021). Ampicillin Plus Ceftriaxone Regimen against *Enterococcus faecalis* Endocarditis: A Literature Review. *Journal of clinical medicine*, 10(19), 4594.

Martins, A., Silva, R. A., Ferreira, L. O., Licate, M. M., Delafiori, C. R., & Pôrto, S. F. (2019). Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 10(0).

Massarine, N. C. M., de Souza, G. H. A., Nunes, I. B., Salomé, T. M., Barbosa, M. D. S., Faccin, I., Rossato, L., & Simionatto, S. (2023). How Did COVID-19 Impact the Antimicrobial Consumption and Bacterial Resistance Profiles in Brazil?. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1374.

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E., & Rossolini, G. M. (2019). AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*, 47(3), 363–375.

Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887–902.

Mohamudha, P. R., Harish, B. N., & Parija, S. C. (2012). Molecular description of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among nosocomial isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in India. *The Indian journal of medical research*, 135(1), 114–119.

Najjuka, C. F., Kateete, D. P., Lodiongo, D. K., Mambo, O., Mocktar, C., Kayondo, W., Baluku, H., Kajumbula, H. M., Essack, S. Y., & Joloba, M. L. (2020). Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteria isolated from urban and rural folks in Uganda. *AAS open research*, 3, 62.

Nakano, V., Campos, M. J. Beta-lactamases - Departamento de Microbiologia. (2016). Departamento de Microbiologia. Obtido de <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/fisiologia/beta-lactamase/>

Nicolle L. E. (1988). Prior antimicrobial therapy and resistance of *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Serratia* to third generation cephalosporins. *The Journal of hospital infection*, 11(4), 321–327.

Normand, A. C., Cassagne, C., Gautier, M., Becker, P., Ranque, S., Hendrickx, M., & Piarroux, R. (2017). Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC microbiology*, 17(1), 25.

Nossair, M. A., Abd El Baqy, F. A., Rizk, M. S. Y., Elaadi, H., Mansour, A. M., Abd El-Aziz, A. H., Alkhedaide, A., Soliman, M. M., Ramadan, H., Shukry, M., & Shaaban, S. I. (2022). Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases and AmpC β -lactamase-Producing Enterobacteriaceae among Human, Cattle, and Poultry. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(8), 852.

Oliveira, J., & Reygaert, W. C. (2019, March 9). Gram Negative Bacteria. Nih.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>

One Health Brasil. (n.d.). One Health Brasil. <https://onehealthbrasil.com>

Oteo, J., Cercenado, E., Cuevas, O., Bautista, V., Delgado-Iribarren, A., Orden, B., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., & Campos, J. (2010). AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and

phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 67(3), 270–276.

Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686.

Pazzani, C., Roberts, I., & Boulnois, G. (1991). Capsule production in *Escherichia coli*: co-ordinate regulation of biosynthesis and export by environmental factors. *Biochemical Society transactions*, 19(3), 628–630.

Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2153–2162.

Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E. C., Zbinden, R., & Bloemberg, G. V. (2011). Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 2924–2932.

Peymani, A., Naserpour-Farivar, T., Yeylagh-Beygi, M., & Bolori, S. (2016). Emergence of CMY-2- and DHA-1-type AmpC β -lactamases in *Enterobacter cloacae* isolated from several hospitals of Qazvin and Tehran, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 8(3), 168–174.

Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) [recurso eletrônico]. (2019).

Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

Popham, D. L., & Bernhards, C. B. (2015). Spore Peptidoglycan. *Microbiology Spectrum*, 3(6).

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458.

Rehana, I., Pandey, A., & Singh, P. (2023). Plasmid-Mediated AmpC (pAmpC) Genotypes Among Uropathogenic *Escherichia coli*: A Hospital-Based Study From Western Uttar Pradesh. *Cureus*, 15(7), e41551.

Rensing, K. L., Abdallah, H. M., Koek, A., Elmowalid, G. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Al Naiemi, N., & van Dijk, K. (2019). Prevalence of plasmid-mediated AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and from retail meat in Zagazig, Egypt. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 45.

Resistência aos antimicrobianos. (n.d.). Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/antimicrobianos>

Reuland, E. A., Halaby, T., Hays, J. P., de Jongh, D. M., Snetselaar, H. D., van Keulen, M., Elders, P. J., Savelkoul, P. H., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Al Naiemi, N. (2015). Plasmid-mediated AmpC: prevalence in community-acquired isolates in Amsterdam, the Netherlands, and risk factors for carriage. *PloS one*, 10(1), e0113033.

Rijal, N. (2021). ESBL and Classification of β -lactamases. *Microbe Online*. <https://microbeonline.com/betalactamase-classification/>

Rocha, F. R., Pinto, V. P., & Barbosa, F. C. (2016). The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 22(4), 301–311.

Rocha, I. V. (2021). Estudo de variantes de betalactamases ADC de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na resistência aos betalactâmicos. *Www.arca.fiocruz.br*. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/60566>

Rocha, L (2015). Pesquisadora fala sobre a resistência causada pelo uso indiscriminado de antibióticos. Fiocruz. Obtido de <https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisadora-fala-sobre-resistencia-causada-pelo-uso-indiscriminado-de-antibioticos>

Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings. Biological sciences*, 285(1876), 20180332.

Ruh, E., Zakka, J., Hoti, K., Fekrat, A., Guler, E., Gazi, U., Erdogmus, Z., & Suer, K. (2019). Extended-spectrum β -lactamase, plasmid-mediated AmpC β -lactamase, fluoroquinolone resistance, and decreased susceptibility to carbapenems in Enterobacteriaceae: fecal carriage rates and associated risk factors in the community of Northern Cyprus. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 98.

Sampaio, J. L., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 31–37.

Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 6.

Seijas-Pereda, L., Rescalvo-Casas, C., Hernando-Gozalo, M., Angmorkie-Eshun, V., Agyei, E., Adu-Gyamfi, V., Sarsah, I., Alfonso-Romero, M., Cuadros-González, J., Soliveri-de Carranza, J., & Pérez-Tanoira, R. (2023). The Antimicrobial Resistance (AMR) Rates of Enterobacteriales in a Rural Hospital from the Eastern Region, Ghana: A Retrospective Study, 2022. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1321.

Serna, C., & Gonzalez-Zorn, B. (2022). Antimicrobial resistance and One Health. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 35 Suppl 3(Suppl 3), 37–40.

Serrettiello, E., Manente, R., Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Iervolino, D., Casolaro, V., Perrella, A., Santoro, E., Galdiero, M., Capunzo, M., Franci, G., & Boccia, G. (2023). Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* before and during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*, 11(8), 1918.

Shbaklo, N., Corcione, S., Vicentini, C., Giordano, S., Fiorentino, D., Bianco, G., Cattel, F., Cavallo, R., Zotti, C. M., & De Rosa, F. G. (2022). An Observational Study of MDR Hospital-Acquired Infections and Antibiotic Use during COVID-19 Pandemic: A Call for Antimicrobial Stewardship Programs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(5), 695.

Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in microbiology*, 7, 1728.

Smalla, K., Jechalke, S., & Top, E. M. (2015). Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiology spectrum*, 3(1), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.

Souza, M. M., & Santos, A. P. (2016). Água potável, água residuária e saneamento no Brasil e na Holanda no âmbito do Programa de Visitação Holandês - DVP: Dutch Visitors Programme. 21(2), 387–395.

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129.

Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership Group (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(8), 1446–1455.

Tavares, W. (2014). Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. Atheneu

- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500.
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
- Tsai, Y. M., Wang, S., Chiu, H. C., Kao, C. Y., & Wen, L. L. (2020). Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC microbiology*, 20(1), 315. M
- Tufic-Garutti, S. D. S., Ramalho, J. V. A. R., Longo, L. G. A., de Oliveira, G. C., Rocha, G. T., Vilar, L. C., Dias da Costa, M., Picão, R. C., Girão, V. B. C., Santoro-Lopes, G., Moreira, B. M., & Rodrigues, K. M. P. (2021). Acquisition of antimicrobial resistance determinants in Enterobacterales by international travelers from a large urban setting in Brazil. *Travel medicine and infectious disease*, 41, 102028.
- Uzunović, S., Ibrahimagić, A., & Bedenić, B. (n.d.). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of AmpC-and/or extended-spectrum (ESBL) β -lactamase- producing *Proteus* spp. clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina.
- Voets, G. M., Fluit, A. C., Scharringa, J., Schapendonk, C., van den Munckhof, T., Leverstein-van Hall, M. A., & Stuart, J. C. (2013). 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(3), 359–362.
- Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 4(4), 567–604.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(11), 1288–1301.
- WHO (2015) World Health Organization. World Health Statistics 2015.
- WHO (2017) World Health Organization. World Health Statistics 2017.
- Zhou, Q., Tang, M., Zhang, X., Lu, J., Tang, X., & Gao, Y. (2022). Detection of AmpC β -lactamases in gram-negative bacteria. *Heliyon*, 8(12), e12245.
- Zhu, B., Zhang, P., Huang, Z., Yan, H. Q., Wu, A. H., Zhang, G. W., & Mao, Q. (2013). Study on drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid-mediated AmpC β -lactamase. *Molecular medicine reports*, 7(2), 664–668.
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 285, 117402.
- Zowawi, H. M., Balkhy, H. H., Walsh, T. R., & Paterson, D. L. (2013). β -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian Peninsula. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 361–380.

9. ANEXO

ANEXO I: Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de uma mudança de paradigma quanto à origem da aquisição de bacilos gram-negativos resistentes aos antimicrobianos: do hospital para a comunidade

Pesquisador: Marcia Garnica

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46762621.2.0000.5455

Instituição Proponente: IMPAR SERVICOS HOSPITALARES S/A

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.812.469

Apresentação do Projeto:

As infecções causadas por BGN MDR (bacilos gram-negativos multidrug resistant) constitui um problema mundial de saúde pública, em que as opções terapêuticas são limitadas ou mesmo inexistentes. A ocorrência delas é maior nos países em desenvolvimento, ocasionando elevada morbidade, mortalidade, impacto econômico e social. Apesar destas bactérias causarem mais infecções em ambientes hospitalares, no Brasil, a contaminação de alimentos e águas recreativas com BGN-RAs já foi descrita, assim como em outros países. Todavia, o papel destes reservatórios de microrganismos multirresistentes na ocorrência das infecções nos pacientes submetidos aos cuidados em saúde não é conhecido. A extensa disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos em diversos ambientes naturais nos sugere uma possível relação entre a exposição e colonização. Entretanto, são poucos os estudos que avaliaram a colonização de indivíduos da comunidade por estes microrganismos, sobretudo no Brasil. Ademais, dentre os estudos que fizeram esta pesquisa, poucos exploraram o papel dos hábitos alimentares, recreativos, socioeconômicos e de estilo de vida nesta ocorrência. A hipótese deste estudo é a de que o ambiente contaminado

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-001

Telefone: (11)3147-9645

E-mail: cep9j@h9j.com.br



Continuação do Parecer: 4.812.469

com estes microrganismos promove a colonização de seres humano que, por sua vez, podem servir como reservatório e veículo destes microrganismos para as instituições de saúde. Portanto, o objetivo do trabalho é determinar a prevalência e a origem da colonização comunitária do TGI por BGN MDR, bem como possíveis fatores de risco associados a esta ocorrência, em pacientes atendidos em uma unidade de pronto atendimento. Para tal, serão coletados espécimes clínicos (fezes ou swabs retais) de 2400 indivíduos, sem histórico de internação recente em instituições de saúde, para a investigação de colonização por BGNs produtores de cefalosporinas do tipo AmpC, ESBL, carbapenemases e com resistência transferível à colistina. Um questionário acerca de hábitos e estilo de vida, bem como dados socioeconômicos será aplicado. Serão recrutados os pacientes atendidos na unidade de pronto atendimento do Complexo Hospitalar de Niterói ao longo de 12 meses, sem restrição de idade, que não possuam hospitalização recente (6 meses antes da coleta do espécime) ou qualquer outra espécie de cuidado médico prolongado, e que atestem participação voluntária no estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os participantes serão convidados a responder um questionário e a fornecer um swab retal. As amostras serão processadas para a identificação e caracterização de susceptibilidade antimicrobiana sob pressão seletiva, incluindo a caracterização quanto ao perfil fenotípico e genotípico de resistência. Os resultados da caracterização fenotípica e genotípica e do questionário serão confrontados com os dados obtidos de estudos complementares para a avaliação de potenciais fontes ambientais para a colonização.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

– Determinar a prevalência e a origem da colonização comunitária do TGI por BGN MDR

Objetivo Secundário:

Objetivos específicos:– Descrever a prevalência de colonização comunitária do TGI por BGN MDR.– Analisar as variáveis epidemiológicas e clínicas potencialmente associadas à aquisição da colonização comunitária do TGI por BGN MDR;– Identificar os determinantes genéticos envolvidos nos

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-001

Telefone: (11)3147-9645

E-mail: ceph9j@h9j.com.br



Continuação do Parecer: 4.812.469

fenótipos de resistência observados;– Identificar as linhagens de BGN MDR mais frequentes na colonização comunitária do TGI;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não estão previstos riscos para os indivíduos incluídos neste projeto. Trata-se de um estudo observacional com coleta de dados mediante entrevista, que não trará qualquer risco aos indivíduos nele incluídos. Não haverá nenhuma interferência da equipe participante do projeto na assistência dos pacientes. O único exame adicional àqueles já indicados pela equipe assistencial será coleta de swab retal para cultura; exame não invasivo que não causa risco ou incômodo adicional aos pacientes. As análises microbiológicas adicionais das amostras bacterianas oriundas dos swabs serão realizadas em colaboração com laboratório de pesquisa de referência para estudo de microrganismos multirresistentes (LIMM, IMPG, UFRJ) sob a responsabilidade da Profª Drª Renata C. Picão. Não serão armazenados espécimes clínicos dos pacientes incluídos no projeto. A coleta e manuseio dos dados serão realizados somente pelos pesquisadores incluídos no projeto. Será garantido sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos e a confidencialidade dos dados dos indivíduos incluídos no estudo. Os resultados serão divulgados de forma compilada em meios tradicionais de divulgação científica como congressos e revistas científicas. Os dados obtidos não serão usados para outros fins não previstos neste protocolo.

Benefícios:

Esperamos, ao longo do desenvolvimento deste projeto, gerar informações sobre a colonização de indivíduos da comunidade por BGN MDR, principais causadores de infecções oportunistas. Esse conhecimento poderá orientar rotinas de prevenção e terapêuticas para este agravo nessa população. Consequentemente, contribuir para a melhoria da assistência prestada. Contudo, as informações geradas poderão não beneficiar diretamente o paciente incluído na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo prospectivo para avaliar colonização por bacilos gram negativos multiresistentes a antimicrobianos em pacientes atendidos em unidade de pronto atendimento.

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-001

Telefone: (11)3147-9645

E-mail: ceph9j@h9j.com.br



Continuação do Parecer: 4.812.469

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE e termos de confidencialidade adequados

Recomendações:

Incluir no projeto de pesquisa o questionário que será aplicado aos pacientes e cuja informação consta do TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

A atualização dos Protocolos de Pesquisa é procedimento obrigatório conforme as Resoluções 466/2012 e 510/16 (a cada seis meses), bem como enviar relatório final, quando do término do estudo (através de "Notificação" via Plataforma Brasil).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1697239.pdf	12/05/2021 07:33:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentonovoendereço.docx	12/05/2021 07:33:30	Marcia Garnica	Aceito
Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	07/05/2021 15:23:33	Marcia Garnica	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinstituicaoCHN1.pdf	07/05/2021 15:23:10	Marcia Garnica	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompletoCEP_semseguimento.docx	04/05/2021 08:54:55	Marcia Garnica	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodeinstituicaoCCS.pdf	04/05/2021 08:47:29	Marcia Garnica	Aceito
Orçamento	orcamento_reduzido.docx	04/05/2021 08:47:12	Marcia Garnica	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	cartaapresentacaoprojeto1.pdf	02/05/2021 17:46:55	Marcia Garnica	Aceito
Outros	curriculumpesquisadores.docx	02/05/2021 17:37:20	Marcia Garnica	Aceito

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.409-001

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3147-9645

E-mail: cep9j@h9j.com.br



Continuação do Parecer: 4.812.469

Outros	termodeconfidencialidade.docx	02/05/2021 17:32:07	Marcia Garnica	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	02/05/2021 17:30:15	Marcia Garnica	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Junho de 2021

Assinado por:
Antonio Carlos Campos Pignatari
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 285 - 1º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.409-001

Telefone: (11)3147-9645

E-mail: ceph9j@h9j.com.br