



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LUIZA RESENDE LARA GABRIEL

**RESISTÊNCIA PLASMIDIAL DO TIPO AMPC NA FAMÍLIA
ENTEROBACTERIACEAE E MÉTODOS DE DETECÇÃO LABORATORIAL**

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da professora Msc Fabíola Fernandes dos Santos Castro.

BRASÍLIA

2018

Resistência plasmidial do tipo AmpC na família Enterobacteriaceae e métodos de detecção laboratorial

Luiza Resende Lara Gabriel¹

Fabiola Fernandes dos Santos Castro²

Resumo

As betalactamases do tipo AmpC são enzimas pertencentes a classe C de Ambler, produzidas por membros da família Enterobacteriaceae e outros bacilos Gram negativos, podendo ser cromossomais ou plasmidiais. Esse mecanismo confere resistência in vivo a grande parte dos betalactâmicos, como as cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, penicilinas e a alguns inibidores de betalactamase, tendo como consequência opções terapêuticas restritas. Por apresentar diferentes tipos, as famílias dessas enzimas foram classificadas de acordo com o seu perfil de resistência possuindo CMY, ACT, DHA, FOX e MIR como exemplos de AmpC plasmidial. Para a detecção dessas enzimas, existem diferentes métodos e técnicas, como os testes genotípicos por meio da PCR e os fenotípicos por meio de disco-difusão em ágar. Esse trabalho foi realizado no formato de uma revisão bibliográfica narrativa, com o objetivo de descrever o mecanismo de resistência plasmidial do tipo AmpC, bem como suas possíveis formas de detecção laboratorial.

Palavras-Chave: Resistência. Enterobacteriaceae. AmpC. Plasmídeo.

AmpC type plasmidial resistance in Enterobacteriaceae family and laboratory detection

Abstract

AmpC betalactamases are enzymes belonged to the Ambler's C class, produced by family members of Enterobacteriaceae and others gram negative bacilli, which could be chromosomal or plasmidial. This mechanism grants in vivo resistance to the majority of betalactamic, like first, second and third generation cefalosporins, penicilins and some betalactamase inhibitors, having restricted therapeutics options as consequences. These enzymes were classified accordingly their resistance profile, by presenting different types, such as CMY, ACT, DHA, FOX and MIR as examples of plasmidial AmpC. Numerous techniques and methods are available to detect these enzymes, for example PCR genotyping and agar disc diffusion phenotyping. This work was carried out in the format of a narrative bibliographic review, with the objective of describing the mechanism of AmpC type plasmid resistance, as well as the possibles forms of laboratory detection.

Key-words: Resistance. Enterobacteriaceae. AmpC. Plasmid.

¹Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB) - luizarlg@sempreceub.com

²Professora do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB) - fabiola.castro@ceub.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Antibióticos são fármacos que podem possuir composições naturais e semissintéticas, como os betalactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos ou serem moléculas sintéticas como as fluoroquinolonas, oxazolidinonas e sulfonamidas. Além disso, podem ser classificados de acordo com sua ação, podendo ser bactericidas, com capacidade de levar a morte, ou bacteriostáticos inibindo o crescimento de micro-organismos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Betalactâmicos compõem um grupo de antibióticos em que, todos seus representantes apresentam o anel betalactâmico, responsável por definir seu mecanismo de ação, que consiste em inibir a síntese da parede celular, porém, sua química não se mostra de forma igual para todos, podendo apresentar diferentes cadeias, gerando diferentes espectros de ação e resistência a enzimas degradadoras (AZEVEDO, 2014).

As enzimas que podem levar a inativação de antibióticos desse grupo, de acordo com sua especificidade, são denominadas de betalactamases, as quais ficam armazenadas no espaço periplasmático bacteriano, sendo nas Gram-negativas, em maior quantidade (KONEMAN, 2008).

Para a classificação dessas enzimas, podem ser utilizados dois métodos, sendo o primeiro de acordo com a identidade dos aminoácidos, método de Ambler, descrito em 1980, ou segundo Bush et al., 1995, que foi atualizado por Bush e Jacoby em 2010, de acordo com a atividade enzimática (SANTIAGO et al., 2016).

O mecanismo de resistência do tipo AmpC é composto por serina-betalactamases produzida por membros da família Enterobacteriaceae e outras Gram-negativas através de genes localizados nos cromossomos ou por indução através de plasmídeos, possuindo relevância clínica devido ao fato de hidrolisarem a maior parte dos antimicrobianos betalactâmicos (CAMPANA, 2009).

A resistência bacteriana é um processo natural que resulta da pressão seletiva do antibiótico sobre a bactéria que ocorre devido, principalmente, a utilização excessiva e inadequada desses fármacos, acarretando em

aumentos da mortalidade e morbidade, além de gerar altos custos, por se tratar de um problema de saúde pública (LOUREIRO et al., 2016).

Esse mecanismo pode ocorrer de forma intrínseca, fazendo parte da herança genética de um gênero ou espécie, ou adquirida, a partir de mutações genéticas e aquisição de fragmentos de DNA extracromossômico, os plasmídeos, que podem ou não se integrar no genoma (FIO; FILHO; GROppo, 2000).

Segundo a OMS, o aumento das resistências bacterianas com cepas multirresistentes, que incluem os antimicrobianos de última geração como ceftriaxona, cefepime e carbapenêmicos vem sendo considerado alarmante (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

O objetivo para este trabalho foi descrever o mecanismo de resistência plasmidial do tipo AmpC, bem como suas possíveis formas de detecção laboratorial.

2. METODOLOGIA

A escolha metodológica para a presente pesquisa foi em formato de uma revisão narrativa que, segundo Rother (2007), é adequada para descrever e discutir sobre qualquer assunto, sendo do ponto de vista teórico ou contextual, permitindo a atualização do conhecimento, em pouco tempo, sobre um determinado assunto. É constituído de análises da literatura, sendo ela publicada em livros, artigos ou revistas, sendo interpretada e possuindo a análise crítica do autor.

A pesquisa consistiu no levantamento de informações a partir de livros de microbiologia, disponibilizados virtualmente e fisicamente pela biblioteca do UniCEUB, artigos científicos, trabalhos de conclusão de curso, revistas e jornais científicos publicados nas áreas relacionados ao título e objetivo do projeto.

Para o levantamento dos artigos científicos foram utilizadas as bases de dados da LILACS, Google Acadêmico e National Center for Biotechnology Information ("PubMed") para a obtenção de novos dados e para comparação com épocas passadas para assim, descrever as possíveis diferenças e novidades a respeito do mecanismo estudado. Para levantamento de teses e

dissertações utilizou-se a base portal de teses da Universidade de São Paulo (USP).

Os idiomas dos trabalhos selecionados foram o português, o inglês e o espanhol e as palavras-chave utilizadas na busca foram: resistência bacteriana; betalactâmicos; betalactamases; AmpC; plasmidial; cromossômica; Enterobacteriaceae; detecção laboratorial. A pesquisa foi feita buscando, principalmente, trabalhos publicados nos últimos 18 anos, porém também foram utilizados artigos mais antigos como fundamentação científica.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Família Enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose, redutores do nitrato que, podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos e, fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e animais (OLIVEIRA et al., 2015).

Nos últimos anos, esses micro-organismos vem sendo considerados como problemas de saúde pública devido a sua alta prevalência e perfil de resistência, sendo muito associados a infecções hospitalares e a mortalidade (AGUILAR, 2009).

Membros dessa família podem ser causadores de qualquer tipo de doença infecciosa e estar presente em qualquer amostra biológica. Os pacientes mais suscetíveis a essas infecções são os imunocomprometidos, os que passaram por procedimentos invasivos ou os que se encontram em ambiente hospitalar (KONEMAN, 2008).

Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* e *Morganella* possuem micro-organismos que causam doenças, em sua maioria, em pacientes imunocomprometidos, sendo considerados patógenos oportunistas. Dentre as doenças frequentemente associadas a alguns desses gêneros estão: sepse neonatal, meningite, infecções do trato urinário (ITU) e respiratório, relacionadas ao *Citrobacter spp.*, bacteremia, infecções de feridas, infecções do trato respiratório e ITU, relacionados a *Serratia spp.*, infecções de pele, do trato respiratório, bacteremia e ITU principalmente

quando associada a cateteres intravesicais, relacionados ao *Proteus spp.* e, ITU e diarreia relacionadas a *Providencia* (JUSTINO, 2018).

Segundo estudos feitos pelo programa de monitoramento de patógenos e resistência em infecções hospitalares e adquiridas na comunidade, alguns micro-organismos como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*, juntamente com *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL), começaram a aparecer como urgência. Apesar disso, ainda foram definidos novos grupos que incluem espécies com resistência plasmidial do tipo AmpC e outras betalactamases adquiridas (AGUILAR, 2009).

O aumento do número de enterobactérias multirresistentes no mundo constitui um grande desafio para laboratórios, hospitais e o serviço de saúde como um todo. Dentre os patógenos considerados como prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS), destacam-se grande parte dos bacilos Gram-negativos, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ambos não fermentadores de glicose) resistentes aos carbapenêmicos e, a família Enterobacteriaceae, principalmente quando produzem ESBL ou apresentam resistência aos carbapenêmicos (OPAS, 2017).

3.2 Antibióticos Betalactâmicos

Durante os anos de 1960 até 1980, as resistências bacterianas emergiram e, devido a isso, novos antibióticos foram introduzidos no mercado, sendo eles semissintéticos, análogos aos naturais que já existiam para o tratamento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Dentre eles, encontravam-se os derivados dos betalactâmicos, análogos de tetraciclina e derivados aminoglicosídicos (FERNANDES, 2006).

Os betalactâmicos fazem parte da primeira classe de derivados de produtos naturais e são os agentes mais utilizados. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a enzima transpeptidase, a qual é responsável pela transpeptidação entre as cadeias NAM (N-acetilmurâmico) e NAG (N-acetilglucosamina) do peptidoglicano, que formam ligações cruzadas, para assim conferir rigidez e resistência a parede celular, ou ligar-se as PBP's

(Penicillin Binding Proteins), as quais são proteínas que realizam a manutenção da parede celular, a fim de manter sua integridade (AZEVEDO, 2014).

Fazem parte desse grupo, as penicilinas (naturais, aminopenicilinas, isoxazolilpenicilinas e amidinopenicilinas), cefalosporinas de primeira geração (cefalexina, cefdroxil), segunda geração (cefuroxima, cefaclor e cefamicinas como cefoxitina), terceira geração (ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima), quarta geração (cefepime), carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e monobactâmicos (aztreonam) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

Em sua maioria, o anel betalactâmico (anel azetidínico, que possui quatro membros) se junta a outro anel de cinco ou seis membros e, dão origem as penicilinas e cefalosporinas, respectivamente (VON NUSSBAUM et al., 2006).

Esse sistema bicíclico é de suma importância para a atividade antimicrobiana, porém quando tensionado ele contribui para a instabilidade do anel betalactâmico, uma vez que se torna suscetível ao ataque de nucleófilos, os quais o hidrolisam (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os principais mecanismos de resistência a essa classe, consistem na presença de enzimas capazes de hidrolisar o anel betalactâmico (betalactamases), alteração da PBP (principalmente em Gram-positivas), alteração da permeabilidade e bombas de efluxo (betalactâmicos são pouco lipofílicos e precisam atravessar uma membrana externa, em Gram-negativos. Além disso, podem acontecer mutações que alteram essa permeabilidade) (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

As cefalosporinas consistem nos betalactâmicos bactericidas de maior uso clínico e, estão subdivididas em: primeira geração, as quais possuem um menor espectro de ação, tendo o uso predominante para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, segunda geração, possuindo maior atividade para Gram-negativas quando comparada com a anterior, terceira geração, as quais possuem seu espectro de ação voltado para Gram-negativos, tendo maior resistência as cefalosporinases e, por último, a de quarta geração, apresentando um maior espectro de ação, com

capacidade de atuar sobre Gram-positivos e Gram-negativos (CLIMENI et al., 2009).

Além das descritas, existem as cefalosporinas de quinta geração, como a ceftarolina e o ceftobiprole, em que seu mecanismo de ação é voltado para *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e pneumococos resistentes a penicilinas e cefalosporinas devido a mutação da PBP, por apresentarem alta afinidade com essas PBPs mutadas (PBP2a e PBP2x) (TAVARES, 2015).

Os carbapenêmicos possuem um amplo espectro de ação, que inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, possuindo uma potente atividade sobre esse último. Além disso, esses medicamentos também possuem boa ação sobre bacilos Gram-negativos produtores de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e contra cepas produtoras de betalactamases do tipo AmpC e, por isso são muitas vezes utilizados na terapia de infecções graves (PENIDO, 2016).

Devido a sua conformação celular mais complexa, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a ação dos antimicrobianos, pois nem todos possuem capacidade de atravessar sua barreira lipídica da membrana externa. Para ter acesso a parede celular, esses agentes devem atravessar canais proteicos localizados nessa membrana, denominados porinas, porém para isso acontecer deve haver compatibilidade química e, por isso, os antibióticos mais eficazes para essas bactérias, são aqueles que possuem grupos ionizáveis em suas estruturas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.3 Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência é uma forma de resposta da bactéria frente ao uso de antimicrobianos e ao meio ambiente. Elas possuem alta capacidade de adaptação, podendo sofrer mutações e/ou adquirir material genético, por meio de plasmídeos de outras bactérias que podem ou não pertencer a mesma espécie (WOODFORD, 2005).

Dentre os mecanismos de resistência aos antibióticos, em geral, encontram-se: bombas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana,

a produção de enzimas degradadoras e, alteração do sítio alvo de ligação (PINA, 2012).

A bomba de efluxo faz parte do mecanismo natural da bactéria que consiste na excreção de substâncias tóxicas, podendo ter essa atividade de forma específica para uma droga ou classe, ou inespecífica e excretar diversos antimicrobianos. Em Gram-negativas, esse sistema é composto por uma proteína transmembrana interna (bomba de efluxo), uma externa (porina) e uma que faz a ligação entre as duas. Quando a expressão dessas proteínas está aumentada, os antibióticos não conseguem permanecer com concentração desejável no micro-organismo e, portanto, não conseguem realizar seu mecanismo de ação de forma desejável (ANDRADE; DARINI, 2007).

A permeabilidade celular é fundamental para que o antibiótico tenha seu efeito, pois ele precisa penetrar na célula para realizar sua função. A alteração dessa permeabilidade está relacionada a alterações estruturais, principalmente nas porinas, localizadas na membrana externa de Gram-negativas, onde encontram-se deletadas, em quantidade reduzida, tamanho reduzido ou com sua seletividade alterada, ocasionando a baixa ou nenhuma concentração do antibiótico em seu interior (DELCOUR, 2009).

Esse mecanismo acontece em bactérias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. A perda de porinas pode diminuir a sensibilidade a algumas cefalosporinas como cefotaxima e cefepime (ANDRADE; DARINI, 2007).

A inativação do antimicrobiano por meio de enzimas é o mecanismo de resistência mais importante e, pode ocorrer por meio da hidrólise, oxi-redução ou transferência de grupo químico. As principais enzimas que conferem esse tipo de resistência são as betalactamases, que causam a destruição dos betalactâmicos por meio da hidrólise do anel betalactâmico, como por exemplo as penicilinas e cefalosporinas, as quais podem ser cromossomais ou adquiridas por meio de plasmídeos (COSTA; JUNIOR, 2017).

A alteração do sítio de ligação faz com que o antibiótico não reconheça mais o seu alvo, impedindo assim de se ligar. Esse mecanismo pode ocorrer de diversas formas, como: alterando as PBP's por meio de

mutações cromossômicas que geram resistência variada aos betalactâmicos, por meio da aquisição de elemento genético chamado *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), o qual carrega o gene *mecA* que gera uma PBP alterada (PBP 2A), presente no *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, ocasionando uma resistência a todos os betalactâmicos e, também pode ocorrer devido a uma alteração na estrutura do peptidoglicano, ocasionada por alterações em seu precursor, inibindo as enzimas que participam de sua construção, como ocorre na resistência a vancomicina (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

3.4 Betalactamases

Segundo o método de classificação de Ambler, as betalactamases são divididas em quatro classes de acordo com a identidade dos aminoácidos: A, B, C e D, em que, A, C e D são serina betalactamases, as quais possuem uma serina em seu sítio catalítico e rompem o anel betalactâmico por meio da hidrólise e, a de classe B, são metallo-betalactamases, que possuem um metal como co-fator e utilizam o zinco para romper esse anel (OLIVEIRA, 2008).

O grupo mais importante é o de classe A, composto por serino-proteases, os quais possuem uma ação de amplo espectro e afinidade com a penicilina, como por exemplo as betalactamases TEM-1 e SHV-1, que podem ser passadas através do cromossomo ou por plasmídeos. As de classe C atuam sobre cefalosporinas e, apesar de poder ser constitutiva ou induzida, esse gene pode ser encontrado no cromossomo de Gram-negativas (MAJIDUDDIN; PALZKILL, 2005).

Segundo Bush e Jacoby (2010) novos subgrupos foram acrescentados na classificação das betalactamases (quadro 1) como um resultado da identificação e expansão dessa família. Essas enzimas foram analisadas com base na sua capacidade de hidrolisar algumas classes específicas de betalactâmicos e, na capacidade de inativação dos inibidores de betalactâmicos, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

O primeiro grupo consistia no das cefalosporinases, que pertenciam a classe molecular C, presente em cromossomos de muitas espécies da família

Enterobacteriaceae (JACOBY, 2009). Essas enzimas são mais eficientes em cefalosporinas do que em penicilinas e geralmente são resistentes a ácido clavulânico e ativas em cefamicinas, como a cefoxitina (BUSH, 1988).

Em micro-organismos como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* existe a baixa expressão da AmpC. Apesar disso, possuem expressão de forma induzível quando expostas a alguns betalactâmicos como amoxicilina, ampicilina e imipenem e ao inibidor ácido clavulânico, (JACOBY, 2009). Quando são produzidos e expressos em larga escala, especialmente em pacientes com pouco acúmulo de betalactâmicos, podem levar a resistência aos carbapenêmicos, como o ertapenem (QUALE et al., 2006).

Quadro 1: Classificação das β -lactamases segundo Bush- Jacoby e Ambler de acordo com a capacidade de hidrólise de betalactâmicos e inativação de inibidores de betalactamases.

Bush-Jacoby	Ambler	Características	Enzimas
1	C	Hidrólise de cefalosporinas e cefamicinas; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam; alta afinidade por aztreonam.	AmpC: CMY-2; FOX-1; MIR-1
1e	C	Hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de espectro expandido, monobactâmicos; não inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam.	GC1;CMY-37
2a	A	Hidrólise eficiente de penicilinas; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	PC1 e outras penicilinases de estafilococos
2b	A	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	SHV-1; TEM-1; TEM-2; TLE-1; TEM-90
2be	A	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de espectro expandido, monobactâmicos; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44; PER-1; SF-1; SHV-5; TEM-10; TEM-26, VEB-1
2br	A	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração; não	IRTs: TEM-30; TEM-76; TEM-

		são bem inibidas por ácido clavulânico.	103; SHV-10; SHV-26
2ber	A	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de espectro expandido e monobactâmicos; menos eficientemente inibida por ácido clavulânico e tazobactam.	CMTs: TEM-50; TEM-68; TEM-89
2c	A	Hidrólise eficiente de carbenicilina; inibidas por ácido clavulânico.	PSE-1; CARB-3
2d	D	Hidrólise eficiente de cloxacilina ou oxacilina; nem sempre inibida por ácido clavulânico.	OXA-1; OXA-10
2de	D	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de espectro expandido; nem sempre inibida por ácido clavulânico.	ESBLs: OXA-11; OXA-15
2df	D	Hidrólise de carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina; nem sempre inibido por ácido clavulânico.	OXA-23; OXA-48
2e	A	Hidrólise eficiente de cefalosporinas; inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.	CepA
2f	A	Hidrólise de carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas; pobremente inibidas por ácido clavulânico e pequena inibição por tazobactam.	IMI-1; KPC-2; SME-1; GES-2
3a	B	Hidrólise de todos os betalactâmicos, exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de íons metálicos; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	IMP-1; L1; NDM-1; VIM-1
3b	B	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos; inibidos por EDTA e quelantes de íons metálicos; não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	CphA; Sfh-1

Fonte: ROCHA, 2014.

Esse grupo também possui enzimas codificadas por plasmídeos, presentes nas famílias CMY, ACT, DHA, FOX, MIR e outras, que são menos frequentes que as betalactamases de espectro estendido (ESBLs) (JACOBY, 2009).

O novo subgrupo 1e, são variantes desse primeiro grupo com uma melhor atividade contra ceftazidima e outras oxyimino-betalactamases, que

ocorrem devido a alterações em aminoácidos, como inserções, deleções e substituições (NORDMANN; MAMMERI, 2007). Elas foram denominadas de AmpC de espectro estendido (ESAC) betalactamases, onde inclui a GC1 em *E. cloacae*, CMY-37 (AHMED; SHIMAMOTO, 2008), CMY-19, CMY-10 e outras, sendo essas últimas mediadas por plasmídeo (LEE; JEONG; PARK, 2003).

O segundo grupo é o mais extenso das betalactamases e inclui as classes moleculares A e D, possuindo diversos subgrupos, como o 2a, que são penicilinases, as quais possuem um espectro de ação limitado e predominam em cocos Gram-positivos (BUSH; JACOBY, 2010).

O grupo 3 é constituído pelas metallo betalactamases (MBLs), as quais possuem baixa afinidade pelos monobactâmicos e não são inibidas pelo tazobactam nem pelo ácido clavulânico, porém quelantes de metal como o EDTA funcionam como inibidores (MARCHIARO, 2008).

O grupo 4, antes existente, passou a não ser mais considerado devido a sua incompleta caracterização e, suas enzimas foram incluídas nos outros grupos já existentes (BUSH; JACOBY, 2010).

3.5 AmpC plasmidial

Em 1940, descobriu-se a primeira enzima de resistência a penicilina em *Escherichia coli*, porém seus estudos genéticos só ocorreram em 1965 e, as mutações com resistência gradual foram denominadas ampA e ampB. A primeira consistia na regulação do gene *ampA* que ocasionava a produção de betalactamases em excesso e, a presença de uma mutação nesse gene *ampA*, gerava redução na resistência e foi denominada ampC (LINDSTROM; BOMAN; STEELE, 1970). Já *ampB*, era um locus que causava alteração do envelope celular (ERIKSONN-GRENNBERG; NORDSTROM; ENGLUND, 1971).

As AmpCs são betalactamases pertencentes ao grupo 1 de Bush e a classe C de Ambler, as quais podem ser encontradas tanto em cromossomos quanto em plasmídeos bacterianos. As enzimas cromossomais foram descritas, principalmente, em membros da família Enterobacteriaceae que fazem parte do grupo CESP: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia*

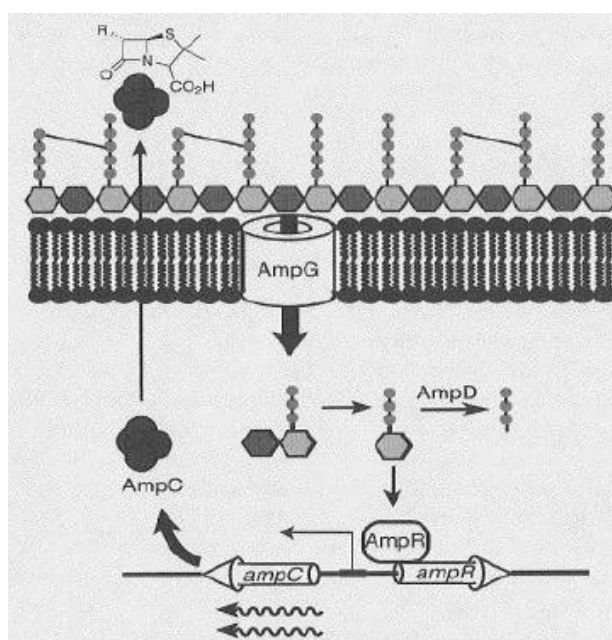
marcescens, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii* (CAMPANA, 2009).

Essas enzimas cromossômicas e plasmidiais, apresentam diferenças quanto a presença de genes acessórios e reguladores, possuindo-os, em sua maioria, quando sua localização é no cromossomo (ROCHA, 2014).

A expressão ou superexpressão de AmpC em bactérias Gram-negativas ocorrem devido a desregulação do gene (do cromossomo) ou pela aquisição de elementos transferíveis, como os plasmídeos (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002). Na família Enterobacteriaceae, frequentemente a expressão dessa enzima é reduzida, porém induzível com a exposição de betalactâmicos, o que é observado em sua maioria nos operons cromossômicos (JACOBY, 2009).

A regulação da AmpC (figura 1) envolve um sistema que contém uma permease da membrana interna (AmpG), que internaliza no citoplasma as subunidades de peptidoglicano, uma amidase citosólica (AmpD), a qual retira monômeros provenientes da parede celular e regula a concentração dos oligopeptídeo, prevenindo a superexpressão de AmpC e, um regulador de transcrição (AmpR) que induz a expressão de AmpC e, intermediários de peptidoglicano (ROCHA, 2014).

Figura 1: Regulação da expressão de AmpC.



Fonte: ROCHA, 2014.

AmpC plasmidiais não possuem genes *ampD*, porém a expressão dessa enzima é aumentada com a perda da função AmpD do cromossomo (REISBIG; HOSSAIN; HANSON, 2003).

Quando comparadas a algumas bactérias da família Enterobacteriaceae que possuem AmpC cromossômica, as AmpC plasmidiais (pAmpC) ou adquiridas (qAmpC) constitutivas são consideradas de alto nível, pois possuem muitas cópias de *bla_{pAmpC}* e, não apresentam AmpR e AmpD. Apesar disso, existem enzimas como CMY-13, DHA e ACT que são induzíveis, apresentando o gene *ampR* (FREITAS, 2011).

As pAmpCs, em sua maioria, tiveram origem em genes cromossômicos de enterobactérias do grupo CESP (quadro 2) que, provavelmente, foram mobilizados através da transposição (SERAL; GUDE: CASTILLO, 2012).

Quadro 2: Origem e diversidade de diferentes tipos de pAmpC.

Origem	Tipo de pAmpC	Ano, País	Enzimas
<i>Aeromonas spp.</i>	CMY-1 MOX FOX	1989, Coreia do Sul 1993, Japão 1994, Argentina	CMY-1, -8, -9, -10, -11, -19 MOX-1, -2, -8 FOX-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10
<i>Citrobacter freundii</i>	CMY-2	1996, Grécia	CMY-2, -3, -4, -5, -6, -7, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -36, -38, -40, -43, -44, -45, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -64
	LAT CFE	1993, Grécia 2004, Japão	LAT-1 CFE-1
<i>Enterobacter spp.</i>	ACT	1997, EUA	ACT-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9
	MIR	1990, EUA	MIR-1, -4, -5
<i>Morganella morganii</i>	DHA	1997, Arábia Saudita	DHA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8
<i>Hafnia alvei</i>	ACC	1999, Alemanha	ACC-1, -4

Fonte: FREITAS, 2011.

Essas enzimas receberam seus nomes conforme sua resistência, sendo: CMY, as que conferem resistência a cefamicinas, FOX, a cefoxitina, MOX, a moxalactam e LAT, a latamoxef (cefamicina de terceira geração). Além dessa forma de nomenclatura, também utilizaram outros métodos, como o tipo de beta-lactamase: ACT, AmpC “type” e, ACC, “Ambler Class C” e, de acordo com o local ou nome do paciente relacionado com a descoberta da resistência, como: MIR (“Miriam Hospital em Providence”), DHA (“Dhahran Hospital” na Arábia Saudita) e, BIL-1 (Bilal, nome do paciente onde foi isolado uma cepa bacteriana com essa enzima citada) (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002).

O primeiro achado de uma pAmpC foi em uma *K. pneumoniae*, na Coreia do Sul, onde a enzima foi denominada de CMY-1 e, apresentava características de resistência a cefoxitina, cefotetan, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (BAUERNFEIND; CHONG; SCHWEIGHART, 1989).

A enzima CMY-2, bem como suas variantes, possuem origem cromossômica em *C. freundii* e, sua primeira descrição foi na Grécia em um isolado de *K. pneumoniae* (BAUERNFEIND; et al., 1996). Consiste na enzima com maior prevalência e distribuição, possuindo relatos na França, Suíça, Brasil, Estados Unidos, Reino Unido, Taiwan, Índia, Paquistão, Grécia, Argentina, Alemanha e outros (JACOBY, 2009).

Existem certos genes da família CMY-2 que estão localizados no cromossomo, como CMY-3, -4, -12, -14, -15 e -16 (D'ANDREA et al., 2006). No ano de 2008, foi descrita uma cepa de *Salmonella spp.* produtora de CMY-2, onde haviam cópias do seu gene tanto no DNA do cromossomo quanto no do plasmídeo (ZIOGA et al., 2009).

A primeira pAmpC induzível de *C. freundii*, CMY-13, foi isolada na Grécia em uma *E. coli* e possuía o gene *ampR* funcionando (MIRIAGOU et al., 2004).

A família DHA (-1, -2 e -3) apresenta alta similaridade com as AmpCs cromossomais de *Morganella morganii* e, por isso, acreditam ter se originado nela (GAILLOT et al., 1997). Em sua maioria, as pAmpCs não são induzíveis, porém DHA-1 foi a primeira induzível a ser descrita e, DHA-2 e DHA-3

também possuem essa mesma característica, pois o gene regulador *ampR* foi transferido junto ao gene *ampC* para o plasmídeo (WU et al., 2005).

Em 2007, DHA-1 foi descrita em *K. pneumoniae* em associação com alteração de permeabilidade das OmpK35 e 36, ocasionando resistência ao imipenem (LEE, 2007).

ACC-1 e ACC-4 são pAmpCs consideradas como exceções desse grupo de enzimas, devido ao fato de não ocasionarem resistência as cefamicinas (GIRLICH et al., 2000).

AmpCs plasmidiais encontram-se em 9 famílias: CMY, possuindo 90 alelos, ACT com 13 variantes, FOX com 10 variantes, DHA e MOX com 8, MIR, ACC, LAT-1 e CFE-1 com 5 (CEJAS et al., 2012).

Essas betalactamases foram descritas pelo mundo todo, porém ainda são menos comuns que as ESBLs (JACOBY, 2009). Seus relatos são, em sua maioria, esporádicos, mas ainda assim são descritos surtos hospitalares por *K. pneumoniae* produtoras de enzimas CMY-1, DHA-1, ACC-1, MIR-1 e ACT-1 (MURATANI; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2006).

Vários elementos genéticos são relacionados as pAmpCs, como por exemplo a sequência de inserção *ISEcp1*, que se associa a várias enzimas CMY (HALDORSEN et al., 2008) e ACC (PARTRIDGE, 2007). Esse elemento, está envolvido na transposição de genes adjacentes e se mostra capaz de mover genes do cromossomo para o plasmídeo (LARTIGUE et al., 2006).

Existem genes *bla_{AmpC}* localizados próximos a uma região comum da sequência de inserção *ISCR1*, relacionada a mobilização de gene em integrons de classe 1 (TOLEMAN; BENNET; WALSH, 2006). DHA-1, MOX-1 e variantes de CMY, como CMY-1, -8,-9,-10,-11 e -19, estão associados a esse elemento (WACHINO et al., 2006).

Plasmídeos que carregam o gene da beta-lactamase do tipo AmpC, frequentemente, levam outros genes de resistências como o de aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tripetoprima e tetraciclina, bem como genes para outras beta-lactamases como TEM-1, PSE-1, CTX-M e SHV (ALVAREZ et al., 2004). Isso ocorre pois, na maioria das vezes, o gene AmpC faz parte de um integron e, muitas vezes o mesmo

gene *bla*_{AMP-C} pode ser incorporado em diferentes plasmídeos (CARATTOLI et al., 2002).

Esse tipo de enzima que confere resistência plasmidial é conhecida desde 1989 (BAUERFEIND; CHONG; SCHWEIGHART, 1989). Segundo Jacoby (2009) o gene *ampC* codifica uma enzima que possui 377 aminoácidos e, as diferenças em suas sequências originaram as famílias AmpC.

Em 2006, 3 cepas de *Shigella flexneri* foram isoladas de pacientes diferentes em Buenos Aires, Argentina, as quais mostraram resistência a cefamicinas e foram submetidas a testes de sensibilidade de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Além disso, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) a fim de identificar genes do tipo AmpC mediado por plasmídeos e, o resultado do sequenciamento revelou identidade com *bla*_{CMY-2} pela primeira vez em *S. flexneri* nesse país e, posteriormente em *K. pneumoniae* (RAPOPORT et al., 2008).

No ano seguinte, foram isoladas 4 cepas de *E. coli* multirresistentes de um paciente em um hospital de São Paulo, Brasil. Esses micro-organismos foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos e a ampliações do DNA por PCR para identificar genes do tipo pAmpC, onde foram identificados os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CMY-2} em todas as cepas (PAVEZ et al., 2008).

O mecanismo de regulação de *ampC* estabelece diferenças entre as beta-lactamases AmpC constitutivas e induzíveis. A expressão da ACT-1 e MIR-1, mesmo sendo uma induzível e outra não induzível, respectivamente, é de 33 a 95% maior do que a expressão gerada pelo gene cromossomal *ampC* de *E. cloacae*. Isso ocorre pois está relacionado a um maior número de genes copiados para as enzimas determinadas por plasmídeos e, devido a uma maior expressão dos genes plasmidiais (JACOBY, 2009).

Enterobactérias que produzem AmpC, seja plasmidial ou cromossômica, são de grande preocupação clínica por apresentarem resistência as cefalosporinas de 1^a, 2^a e, muitas vezes, de 3^a geração (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002). E, apesar de não conferirem resistência aos carbapenêmicos com apenas esse mecanismo de resistência, quando

associadas a perda de porinas podem gerar redução da sensibilidade ou resistência a esses antimicrobianos (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

A presença das pAmpC gera um maior espectro de resistência aos antibióticos do que as ESBLs, pois hidrolisam penicilinas, oximinocefalosporinas e cefamicinas, como a cefoxitina e o cefotetan, além de que não são inibidas pelos inibidores de betalactamases, como o ácido clavulânico (FREITAS, 2011).

Um novo tipo de AmpC foi estudado, a AmpC de espectro estendido (ESAC-“Extended-spectrum AmpC”), a qual tem sido considerada alarmante devido a dificuldade terapêutica em cepas produtoras dessa enzima, visto que conferem baixa suscetibilidade as cefalosporinas, incluindo as de quarta geração (PIRES et al., 2015).

Inserções, substituições ou deleções de aminoácidos na hélice H-10 da molécula da enzima podem conferir esse mecanismo de resistência em AmpCs cromossômicas e plasmídias (SANTIAGO et al., 2016).

Pires et al. (2015) relataram o primeiro caso de uma pAmpC, do tipo CMY-2, que adquiriu essa resistência estendida e passou a ser uma pESAC do tipo CMY-33, durante terapia feita utilizando cefepime. Essa resistência ocorreu devido a uma deleção dupla de aminoácidos na hélice H-10 da proteína. Essa betalactamase, CMY-33, mostra-se semelhante a uma ESBL, pois possui um alto “MIC” (concentração inibitória mínima) para cefepime e baixo para cefoxitina e ampicilina.

Os carbapenêmicos eram considerados os únicos betalactâmicos estáveis frente as pAmpC (JACOBY, 2009). Porém, verificou-se que algumas enzimas como CMY-2, ACT-1 e DHA-1 possuíam ação de hidrólise contra alguns deles (MAMMERI et al., 2010).

3.6 Detecção laboratorial

A grande variedade de enzimas do tipo AmpC plasmidial na família Enterobacteriaceae, juntamente com sua possível associação com genes de resistência, sua rápida transmissão e, resultados não confiáveis em equipamentos automatizados faz com que a detecção dessas

betalactamases seja um desafio no laboratório de microbiologia (INGRAM et al., 2011).

As pAmpCs podem apresentar um fenótipo semelhante as ESBLs em testes laboratoriais, pois podem apresentar resistência as quinolonas e ao trimetoprim-sulfametoxazol, além da resistência as cefalosporinas de terceira geração, sendo que essa última também pode ser observada nas AmpCs cromossomais (HARRIS, 2015).

Para a detecção de pAmpCs, os métodos utilizados podem ser genotípicos ou fenotípicos (SERAL; GUDE; CASTILLO, 2012). Esse primeiro é baseado em técnicas moleculares de identificação do gene e, o segundo avalia a capacidade de hidrólise de determinados antibióticos. Os métodos fenotípicos ou não moleculares (figura 1) podem ser divididos em: os que detectam sua atividade em extratos enzimáticos e, os que avaliam os efeitos induzidos pelos inibidores de AmpC sobre as enzimas (GUDE et al., 2012).

O uso desses testes de forma combinada mostra-se relevante devido ao fato de que no método molecular pode haver a detecção de genes de resistência que não se expressam fenotipicamente (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

De acordo com BrCAST (2017), para a detecção de AmpCs plasmidiais ou adquiridas na família Enterobacteriaceae, deve-se avaliar a resistência a cefoxitina, por meio de disco difusão ou fita de E-test, juntamente com ceftazidima e/ou cefotaxima (figura 2).

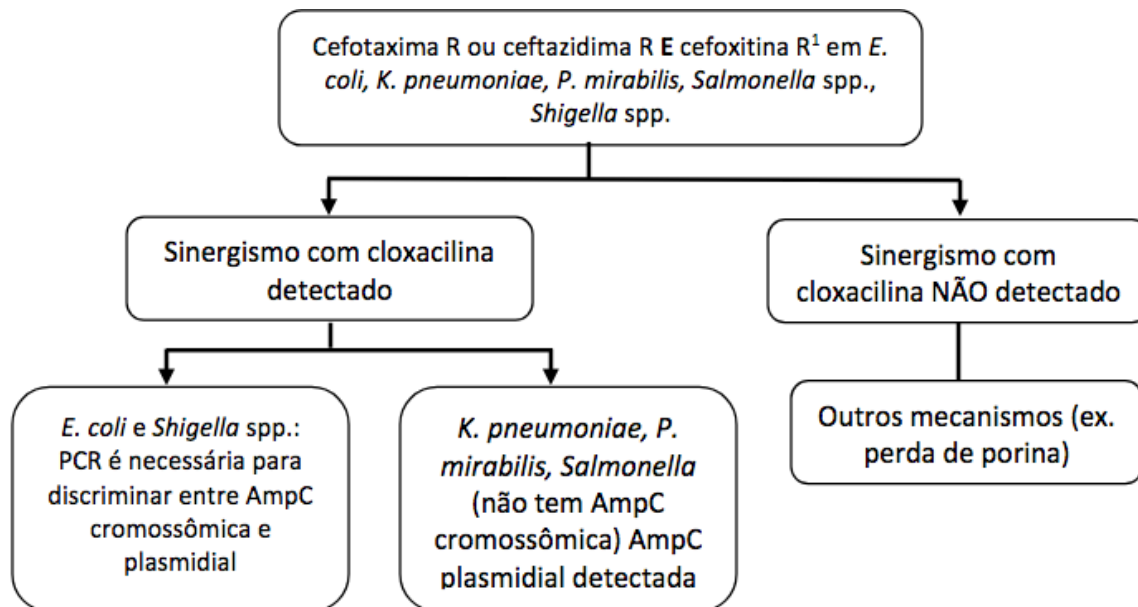
Esse teste pode ser realizado avaliando a dupla sinergia entre discos de cefoxitina com ceftazidima ou cefotaxima colocados, no máximo, a 20 mm de distância entre eles (figura 3) (RUPPÉ et al., 2006).

E também pode ser aplicado com o uso da cloxacilina (figura 3), utilizando um disco desse inibidor e um disco de ceftazidima ou cefotaxima e, além desse, pode-se utilizar o E-test por meio de uma tira de cefotetan/cefotetan-cloxacilina (BRANDÃO, 2013).

Ao se utilizar esses métodos fenotípicos, quando a enzima em estudo é detectada, deve-se avaliar se o micro-organismo é conhecido por apresentar tal enzima em seu cromossomo, caracterizando assim uma AmpC cromossômica ou, se não é conhecida a presença dessas enzimas, como em

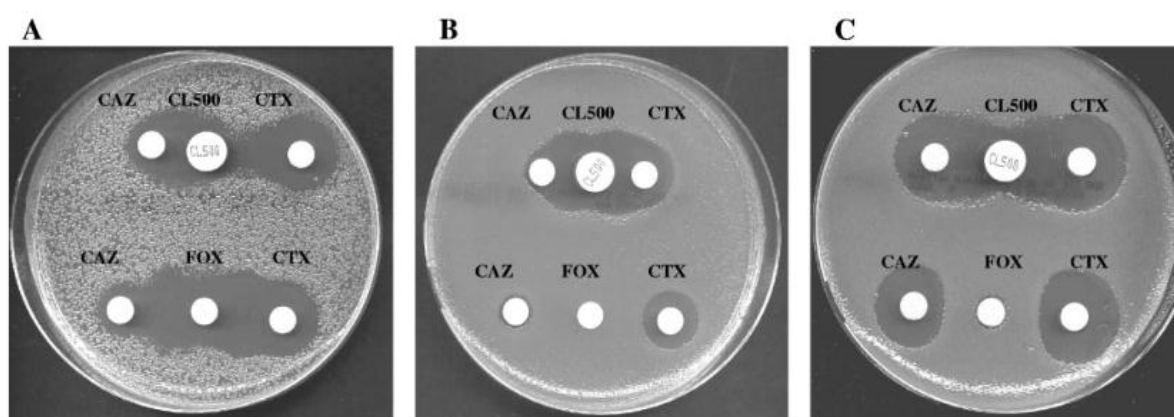
Klebsiella, *Proteus* e *Salmonella*, caracterizando uma AmpC plasmidial (ROIAS, 2017).

Figura 2: Fluxograma para detecção de AmpC.



Fonte: BrCAST, 2017.

Figura 3: Disco duplo de sinergia em ágar Muller-Hinton com cefalosporinas de amplo espectro (CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; FOX: cefoxitina) e cloxacilina (CL500). (A) *C. freundii* portador de ACC-1, (B) *C. freundii* portador de AmpC cromossomal e (C) *K. pneumoniae* portadora de DHA-1.



Fonte: RUPPÉ et al., 2006.

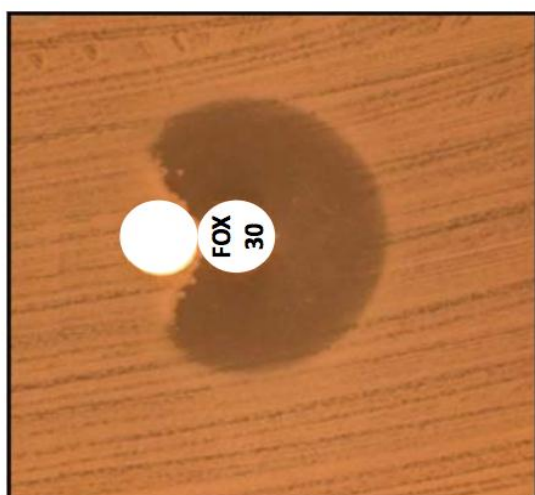
Apesar da semelhança com as ESBLs no antibiograma, quando se realiza o teste de sinergia com ácido clavulânico ou cloxacilina, percebe-se a

diferença entre as duas, pois a AmpC, ao contrário da ESBL, é inibida. Também é possível observar a sensibilidade a cefoxitina nas ESBLs, pois não conseguem hidrolisar essa droga devido ao fato de serem cefamicinas (HARRIS, 2015).

Outro teste utilizado, consiste no uso de potentes inibidores, como o ácido fenilborônico, onde coloca-se em ágar Muller-Hinton a bactéria a ser testada e um disco de cefotetan contendo o ácido. Seu resultado será positivo se a bactéria for inibida e apresentar um halo maior ou igual a 5 mm, porém esse teste não se mostra útil na identificação de todas as enzimas do tipo AmpC (COUDRON, 2005). Uma desvantagem desse método é que ele também é aplicado para a identificação de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), a qual também se mostra inibida (BRANDÃO, 2013).

Além desses, dentre os métodos fenotípicos encontra-se o disco de AmpC (figura 4), que deve ser colocado após inoculação de uma cepa controle em meio Muller-Hinton, que seja sensível ao disco de cefoxitina, ao lado desse disco deve ser colocado o disco de Tris-EDTA contendo a cepa a ser testada. O Tris-EDTA, irá permitir a saída das betalactamases da bactéria testada e, o teste será positivo se houver achatamento no halo de inibição de cefoxitina. Esse método permite descartar a possibilidade da resistência ser causada por uma perda de porinas (FREITAS, 2011).

Figura 4: Teste AmpC em disco.



Fonte: FREITAS, 2011.

O método molecular é mais confiável para a detecção de AmpC é a PCR, por meio da amplificação de seu gene (SANTIAGO et al., 2016). D'Andrea et al (2006) utilizaram 4 pares de primers que incluíam diversos grupos de pAmpC para a realização de PCR *multiplex*. Já Brolund et al. (2012) modificaram a técnica para ser aplicada em tempo real.

Diversos protocolos já foram utilizados para a realização da PCR *multiplex* dentre eles o segundo Perez-Perez e Hanson (2002), Dallene (2010) e Rocha (2014). Para essas reações foram descritos diversos iniciadores, tais como MOXMF, MOXMR, DHAMF, DHAMR, CMY-G1-MOX-RV, CMY-G1-MOX-FW, MIR-ACT-1052-RV, MIR-ACT-456-FW e MultiCaseACC_for, MultiCaseACC_rev, MultiCaseDHA_for, MultiCaseDHA_rev (ROCHA, 2014).

A PCR *multiplex* e outros testes genotípicos são capazes de identificar diversos genes AmpC, incluindo suas variantes e diferentes famílias porém, apesar de ser uma técnica padrão ouro, não é viável a realização de um grande número de amostras em rotinas laboratoriais e hospitalares devido ao seu alto custo. Já os testes fenotípicos, são de fácil execução, boa sensibilidade e de baixo custo, tornando-se a opção viável na prática (ROIAS, 2017).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso indevido dos antibióticos, bem como sua utilização em excesso contribuem para a resistência bacteriana, a qual é considerada um problema de saúde pública global e, que favorece o aumento do número de infecções que não são facilmente tratadas devido ao antibiótico não possuir a ação necessária contra o patógeno.

Ao se tratar da família Enterobacteriaceae, o principal aumento da resistência está relacionado aos betalactâmicos, onde as AmpCs plasmidiais têm se mostrado relevantes.

O conhecimento a respeito dos diversos tipos de resistência e, a correta detecção laboratorial dos micro-organismos e seus respectivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, mostram-se de suma importância, pois são utilizados para dar direcionamento ao tratamento clínico do paciente.

No caso da resistência do tipo AmpC, seja ela plasmidial ou cromossômica, a falta de seu conhecimento ou uma detecção errônea, pode levar a hiperprodução da enzima e, conseqüente desenvolvimento da resistência ao longo da terapia, devido ao fato de algumas cepas apresentarem sensibilidade *in vitro*, porém ao serem expostas a algum agente indutor durante o tratamento aumentam a sua produção, conferindo assim, resistência e falha terapêutica com possível piora clínica do paciente.

Portanto, as diretrizes disponibilizadas, como CLSI, BrCAST e outros, devem ser sempre atualizadas de forma a acrescentar um padrão de referência bem definido que consiga detectar as betalactamases do tipo AmpC, tanto cromossômica quanto plasmidial em bacilos Gram-negativos, pois o principal método fenotípico utilizado baseia-se na sensibilidade as cefamicinas, fato que pode ser mascarado pela perda de porinas, ressaltando assim a necessidade de testes fenotípicos específicos e confirmatórios para a detecção dessa enzima, a fim de que sejam implantados na rotina de hospitais e laboratórios.

Além disso, mostra-se relevante a necessidade da criação de métodos diagnósticos que sejam mais rápidos e eficazes, para detecção de AmpC cromossômica e plasmidial, visto que o método molecular, considerado como padrão ouro, possui alto custo, sendo inviável para aplicação na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Atualização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, p. 240-244, set. 2017.

AGUILAR, M. A. P. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros**. 2009. 133f. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2009.

AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Emergence of a cefepime- and ceftazidime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC beta-lactamase, CMY-37. **International journal of antimicrobial agents**. Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 256-261, set. 2008.

ALVAREZ, M., et al. Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Massachusetts, v.48, n. 2, p. 533-537, fev. 2004.

ANDRADE, L, N; DARINI, A, L, C. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Curso básico de antimicrobianos**. 2007.

AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-Lactâmicos**. Porto, p. 7-9, 2014.

BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCHWEIGHART, S. **Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins**. Journal for the clinical study and treatment of infections. Alemanha, v. 17, n. 5, p. 316-321, set/ out. 1989.

BAUERNFEIND, A. et al. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 40, n. 1, p. 221-224, jan.1996.

BRANDÃO, C. S. C. **Aplicação de testes fenotípicos para detecção de AmpC**. 2013. 118 f. Tese de mestrado apresentada a Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.

BrCAST (“Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”). **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. 2017. Disponível em: <http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2018/10/Orienta%C3%A7%C3%B5es-do-EUCAST-para-a->

detec%C3%A7%C3%A3o-de-mecanismos-de-resist%C3%Aancia-e-resist%C3%Aancias-espec%C3%ADficas.pdf. Acesso em: 10 nov. 2018.

BROLUND, A. et al. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. **Journal of Microbiological Methods**. Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 188, jan. 2012.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12^a ed., Estados Unidos: McGraw-Hill, 2012.

BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 1, n. 1, p. 109-123, jan./ 1988.

BUSH, K. Characterization of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 33, n. 3, p. 259-263, mar.1989.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, jun. 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, mar. 2010.

CAMPANA, E. H. **Freqüência de Enterobactérias Produtoras de β -Lactamases AmpC Plasmidiais Isoladas em Infecção de Corrente Sangüínea**. 2009. 138f. Tese de mestrado apresentada a Universidade Federal de São Paulo, 2009.

CARATTOLI, A., et al. Characterization of Plasmids Carrying CMY-2 from Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains Isolated in

the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 46, n. 5, p. 1269-1272, maio 2002.

CEJAS, D. et al. Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers. **Revista Argentina de Microbiologia**. Buenos Aires, v. 44, n. 3, p. 182-186, jul./ set. 2012.

CLIMENI, B. S. O.; et al. Cefalosporinas: sua origem, uso e função em animais de grande e pequeno porte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. São Paulo, v. 7, n. 12, p. 2, jan. 2009.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão da literatura**. Amapá. Estação Científica, v. 7, n. 2, p. 45-57. 2017.

COUDRON, P. E. Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 43, n. 8, p. 4163-4167, ago. 2005.

D'ANDREA, M. M., et al. CMY-16, a Novel Acquired AmpC-Type β -Lactamase of the CMY/LAT Lineage in Multifocal Monophyletic Isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 50, n. 2, p. 618-624, fev. 2006.

DELCOUR, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**. Houston, v.1794, n. 5, p. 808-816, mai. 2009.

DEL FIO, F. S.; DE MATTOS FILHO, T. R.; GROppo, F. C. Resistência bacteriana. **Revista Brasileira de Medicina**. Rio de Janeiro, v. 57, n. 10, p. 1129-1140, 2000.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11-21, 2008.

ERIKSONN-GRENNBERG, K. G.; NORDSTROM, K.; ENGLUND, P. Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins IX. Genetics and Physiology of Class II Ampicillin-Resistant Mutants That Are Galactose Negative or Sensitive to Bacteriophage C21, or Both. **Journal of Bacteriology**. Suécia, v. 108, n. 3, p. 1210–1223, dez. 1971.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature Biotechnology**. Nova Iorque, v. 24, n.12, p. 1497-1503, dez. 2006.

GAILLOT, O. et al. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. Londres, v. 39, n. 1, p. 85-87, jan. 1997.

GIRLICH, D.; et al. Biochemical-Genetic Characterization and Regulation of Expression of an ACC-1-Like Chromosome-Borne Cephalosporinase from *Hafnia alvei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 44, n. 6, p. 1470-1478, jun. 2000.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**. São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010.

HALDORSEN, B. et al. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. Londres, v. 62, n. 4, p. 694-702, out. 2008.

HARRIS, P. Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae that Express Extended-Spectrum β -Lactamase and AmpC Enzymes. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. Nova Iorque, v. 36, n. 1, p. 56-73, jan. 2015.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 22, n. 1, p. 161-182, jan. 2009.

JUSTINO, I. A. **Investigação de resistência adquirida e epidemiologia molecular em enterobactérias produtoras de AmpC cromossômica isoladas de pacientes hospitalizados**. 2018. 67f. Tese de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). 2018.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LARTIGUE, M. F.; et al. In Vitro Analysis of *ISEcp1B*-Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene *bla_{CTX-M}* of *Kluyvera ascorbata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 50, n. 4, p. 1282-1286, abr. 2006.

LEE, S. H.; JEONG, S. H.; PARK, Y. M. Characterization of *bla*CMY-10 a novel, plasmid-encoded AmpC-type-lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. **Journal of applied microbiology**. Oxford, v. 95, n. 4, p. 744-752, set. 2003.

LEE, K.; et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β -lactamases co-mediated by porin loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 201-206, fev. 2007.

LINDSTROM, E. B.; BOMAN, H. G.; STEELE, B. B. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. **Journal of bacteriology**. Suécia, v. 101 n. 1, p. 218-31, jan. 1970.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**. Lisboa, v. 34, n. 1, p. 77-84, jan/abr. 2016.

MAJIDUDDIN, F. K.; PALZKILL, T. Amino Acid Residues That Contribute to Substrate Specificity of Class A β -Lactamase SME-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 49, n. 8, p. 3421-3427, ago. 2005.

MIRIAGOU, V.; et al. CMY-13, a Novel Inducible Cephalosporinase Encoded by an *Escherichia coli* Plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 48, n. 8, p. 3172-3174, ago. 2004.

MURATANI, T.; KOBAYASHI, T.; MATSUMOTO, T. Emergence and prevalence of beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cephems in Japan. **International journal of antimicrobial agents**. Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 491-499, jun. 2006.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. **Future Microbiology**. Londres, v. 2, n. 3, p. 297-307, jun. 2007.

OLIVEIRA, K. R. P. **β -lactamases na família Enterobacteriaceae : Métodos de detecção e prevalência**. p. 89, 2008.

OLIVEIRA, M. A. et al. *Enterobacteriaceae*: bactérias intestinais de organismos aquáticos um risco à saúde pública- revisão de literatura. **Revista científica de medicina veterinária**, São Paulo, n. 25, p.1-20, julho, 2015.

OPAS. Organização Pan-Americana da saúde. 2017. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.**

Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812. Acesso em: 20 Nov. 2018.

PARTRIDGE, S. R. Genetic Environment of ISEcp1 and bla_{ACC-1}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 51, n. 7, p. 2658-2659, jul. 2007.

PAVEZ, M., et al. Emergence of carbapenem-resistant Escherichia coli producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v. 57, n. 12, p. 1590-1591, dez. 2008.

PENIDO, C. **Carbapenêmicos (beta-lactâmicos)**. Disponível em:

https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:2S0S-Ji6l6cJ:https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3480829/mod_folder/content/0/Carbapen%25C3%25AAmicos%2520v1.pdf%3Fforcedownload%3D1+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br&client=firefox-b-ab. 2016. Acesso em: 10 set. 2018.

PHILIPPON, A., ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 46, n.1, p. 1-11, jan. 2002.

PINA, E. C. S. **Estudo da suscetibilidade a antibióticos de enterobactérias isoladas nos Hospitais da Universidade de Coimbra: detecção laboratorial de β -lactamases**. 2012. 63 f. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 50, n. 5, p. 1633-1641, maio 2006.

RAPOPORT, M., et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 31, n. 4, p. 385–387, abr. 2008.

REISBIG, M. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of Enterobacter origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Londres, v. 51, n. 5, p. 1141-1151, maio 2003.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X Revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**. São Paulo, Brasil. v. 20, n. 2, abr. 2007.

ROCHA, D. A. C. **Caracterização fenotípica e genotípica de betalactamases do tipo AmpC plasmidial em *Escherichia coli***. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Farmácia Área Análises Clínicas a faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROIAS, C. **Beta-lactamase AmpC: atualização do diagnóstico laboratorial e estratégia terapêutica**. Tese de mestrado apresentada a Universidade de Lisboa, julho, 2017.

RUPPÉ, E. et al. First Detection of the Ambler Class C 1 AmpC β -Lactamase in *Citrobacter freundii* by a New, Simple Double-Disk Synergy Test. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 44, n. 11, p. 4204-4207, nov. 2006.

SANTIAGO, G. S.; et al. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 17-30, dez. 2016.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactâmicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Barcelona, 27(2),p. 116-129, fev. 2009.
TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Reino Unido, v. 70, n. 2, p. 296-316, jun. 2006.

VON NUSSBAUM, F.; et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, ago. 2006.

WACHINO, J.; et al. Horizontal Transfer of *bla*_{CMY}-Bearing Plasmids among Clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Emergence of Cefepime-Hydrolyzing CMY-19. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 50, n. 2, p. 534-541, jan. 2006.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**. Londres, v. 11, n. 3, p. 2-21, maio 2005.

WU, L. et al. Identification of a novel cephalosporinase (DHA-3) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Taiwan. **Clinical Microbiology and Infection**. Taiwan, v. 11, n. 11, p. 893-897, nov. 2005.

ZIOGA, A. CMY-31 and CMY-36 Cephalosporinases Encoded by ColE1-Like Plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. Atenas, v. 53, n. 3, p. 1256-1259, mar. 2009.