



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA



DETECÇÃO DOS GENES *bla* EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
ESBL ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇAS
HEMATOLÓGICAS

NAYANNE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA ALMEIDA

MANAUS

2011

NAYANNE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA ALMEIDA

**DETECÇÃO DOS GENES *bla* EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
ESBL ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇAS
HEMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar
em Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas, para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia, área de
concentração Saúde.

Orientador: **Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade**

Co-orientadora: **Prof^a MSc. Cristina Motta Ferreira**

MANAUS

2011

FOLHA DE JULGAMENTO**DETECÇÃO DOS GENES *bla* EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
ESBL ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇAS
HEMATOLÓGICAS****NAYANNE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA ALMEIDA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas”.

Banca Julgadora:

**Prof. Edmar Vaz de Andrade, Dr.
Presidente/UFAM**

**Patrícia Puccinelli Orlandi, Dra.
Membro/FIOCRUZ**

**Luciana Leomil
Membro/ UFAM**

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre acreditou em mim,
nos meus sonhos e em minha capacidade.
Que sempre me apoiou e incentivou.
Em especial a minha mãe,
grande exemplo de força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e forças para desenvolver esta pesquisa.

A minha família, que sempre me apoio nas horas mais críticas e nos bons momentos, e que acreditaram em mim, mesmo quando nem eu acreditava e em especial a minha mãe pelo “mãetrocínio” na compra da cepa ATTC e a minha irmã pela paciência.

Ao meu orientador, Dr. Edmar, pela paciência, apoio e conhecimento transmitido, pela orientação e a amizade desenvolvida ao longo do trabalho.

Ao PPG-Biotec, em nome do Dr. Odair pelo auxílio na compra de materiais e reagentes e a Fundação Astolfi-filho pelo material de laboratório.

À minha co-orientadora, MSc. Cristina Motta, pelo conhecimento transmitido sobre microbiologia clínica e pela orientação.

Ao colaborador do projeto, William Ferreira pelo apoio e paciência em me passar dicas sobre escrita de trabalhos.

A minha amiga Lívia, pelo carinho e amizade.

Aos profissionais da FUAM, Ronaldo, pela amizade e as técnicas do laboratório de Bacteriologia Mara e Fátima, pelo profissionalismo e companheirismo no laboratório.

A Fundação Alfredo da Matta e ao HEMOAM, por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram direta e indiretamente na realização desta pesquisa.

RESUMO

A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) entre os isolados clínicos de bactérias Gram-negativas é um importante mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. É a maior causa de falha terapêutica utilizando as cefalosporinas, ocasionando assim limitações na escolha terapêutica e são mediadas por plasmídeos e têm a capacidade de hidrolisar oximinocefalosporinas e aztreonam. Este trabalho teve como objetivo identificar os principais genes responsáveis pela produção das ESBLs em bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*. Foram estudadas 12 bactérias Gram-negativas que apresentaram fenótipo positivo para ESBL isoladas de pacientes portadores de doenças hematológicas atendidos na Fundação HEMOAM no período de julho de 2007 a agosto de 2008. A detecção e identificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} foram realizadas por PCR e seqüenciamento nucleotídico. A *E. coli* foi a bactéria mais freqüente entre os isolados. Todos os isolados ESBL positivos foram suscetíveis ao imipenem e apresentaram resistência ao cloranfenicol e a tetraciclina. As bactérias carregavam genes para TEM, SHV, CTX-M e OXA tanto em cromossomos como em plasmídeos. A presença de multigenes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}) e a resistência a antibióticos não- β -lactâmicos detectados nas enterobactérias e não-enterobactérias isoladas de amostras clínicas nesta pesquisa se torna relevante pois, oferece informações em nível de saúde pública da presença deste tipo de resistência aos antibióticos em nossa região.

Palavras-chave: ESBLs, genes, resistência

ABSTRACT

The production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among clinical isolates of Gram-negative bacteria is an important mechanism of resistance to β -lactam antibiotics. It is the major cause of treatment failure using cephalosporins, thereby causing limitations in therapeutic choice and are enzymes mediated by plasmids that have the ability to hydrolyse oximino-cephalosporins and aztreonam. This study aimed to identify key genes responsible for production of ESBLs in Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* family. There were 12 Gram-negative bacteria that were positive for ESBL isolated from patients with hematologic malignancies treated at HEMOAM Foundation from July 2007 to August 2008. The detection and identification of genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA} were performed by PCR and nucleotide sequencing. *E. coli* bacteria were more frequent among ESBL isolates. All isolates were susceptible to imipenem and were resistant to chloramphenicol and tetracycline. The bacteria carried genes for TEM, SHV, CTX-M and OXA on both chromosomes and in plasmids. The presence of multigene (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA}) and the non-antibiotic resistance detected in the β -lactam and non-enterobacteria *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens in this research is relevant because it provides information about the presence of this threat antibiotic resistance in our region.

Keywords: ESBLs, genes, resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração esquemática da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	16
Figura 2	Estrutura molecular dos grupos de antibióticos β -lactâmicos	25
Figura 3	Desenho esquemático da hidrólise do anel β -lactâmico indicado pela seta	26
Figura 4	Desenho esquemático da propagação clonal e modelo de disseminação plasmídica. <u>A.1</u> : Surgimento de uma ESBL devido a uma mutação ocorrida em um gene <i>bla</i> situado num plasmídeo pré-existente; <u>A.2</u> : Aquisição do plasmídeo contendo o gene <i>bla</i> pelo clone A e propagação devido à seleção e a dispersão clonal; <u>A.3</u> : Transmissão do plasmídeo e disseminação em diferentes clones (B e D) contendo o plasmídeo com gene para ESBL; <u>A.4</u> : Transmissão plasmidial do gene <i>bla</i> para outro clone (E) contendo outro plasmídeo de resistência	32
Figura 5	Freqüência em isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL (2004-2006) em diferentes regiões geográficas	333
Figura 6	Substituições dos aminoácidos em derivados de ESBL tipo TEM. Os aminoácidos em destaque (cinza) são encontrados no gene para β -lactamase TEM-1 (círculos: Alterações importantes para produção do fenótipo ESBL)	36
Figura 7	Substituições dos aminoácidos em derivados de ESBL tipo SHV. Os aminoácidos em destaque (cinza) são encontrados no gene para β -lactamase SHV-1 (círculos: principais mutações para o fenótipo ESBL)	37
Figura 8	Fitas utilizadas na realização do Etest [®] ESBL com os gradientes de concentrações dos antibióticos CT e TZ com e sem associação ao ácido clavulânico	50
Figura 9	Detecção de ESBL em bactérias Gram-negativas isoladas de amostras clínicas. A detecção de ESBL foi realizada pelo Etest [®] ESBL. Antibióticos: CT e CT/CTL (fita superior de cada placa), TZ e TZ/TZL (fita inferior em cada placa). A a D são amostras clínicas de <i>E. coli</i> . A e B: ESBL negativa; C e D: ESBL positivo; E: <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 (controle positivo)	62
Figura 10	Detecção de DNA plasmidial em cepas Gram-negativas ESBL positivas. M: Ladder 2 a 10 Kb (Promega, Madison, WI, USA); 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i> ; 19: <i>Serratia liquefaciens</i>	63
Figura 11	Detecção do gene <i>bla</i> _{TEM} cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: branco; NgTC: Cepa de <i>N. gonorrhoea</i> utilizada controle negativo. 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.;	

	21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	64
Figura 12	Detecção do gene <i>bla</i> _{TEM} plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: branco; Ng: Controle negativo. A seta indica o fragmento de 867pb correspondente a região codificadora do gene <i>bla</i> _{TEM} . 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	65
Figura 13	Esquema representativo do tamanho das sequências para <i>bla</i> _{TEM-1} obtidas neste estudo (cepas 3 e 4) e o local na sequência de referência (TEM-1 GU73469.1) onde elas estão possivelmente inseridas	66
Figura 14	Detecção do gene <i>bla</i> _{SHV} no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: Branco; Kp: Controle positivo – <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603. 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	67
Figura 15	Detecção do gene <i>bla</i> _{SHV} no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: 100pb DNA Ladder; B: Controle negativo; A1Kp: Controle positivo (<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603). 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	68
Figura 16	Esquema representativo do tamanho das sequências para <i>bla</i> _{SHV-1} obtidas neste estudo (cepas 3, 4, 15 e 18) e o local na sequência de referência (SHV-1 AF148850) onde elas estão possivelmente inseridas	69
Figura 17	Detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M} no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: branco. 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	70
Figura 18	Detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M} no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: branco; Ng: controle negativo. 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	71
Figura 19	Esquema representativo do tamanho das sequências para <i>bla</i> _{CTX-M-15} obtidas neste estudo (cepas 3, 12, 13, 15, 17, 18, 21, 26, 34, 37 e 39) e o local na sequência de referência (CTX-M-15 HQ175999) onde elas estão possivelmente inseridas.....	72
Figura 20	Detecção do gene <i>bla</i> _{OXA} no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: Branco; Kp: controle negativo. 3: <i>Pseudomonas</i> spp; 4: <i>Serratia</i> spp.; 12: <i>B. cepacia</i> ; 13: <i>B. cepacia</i> ; 15: <i>E. coli</i> ; 17: <i>E. coli</i> ; 18: <i>Serratia</i> spp.; 21: <i>E. coli</i> ; 26: <i>P. stutzery</i> ; 34: <i>E. coli</i> ; 37: <i>E. coli</i> ; 39: <i>E. coli</i>	73

- Figura 21 Detecção do gene *bla*_{OXA} no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. M: Marcador (100pb DNA Ladder); B: Branco; A1Kp e 3Ng: controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli* 74
- Figura 22 Esquema representativo do tamanho das sequências para *bla*_{OXA-1} obtidas neste estudo (cepas 12, 13, 15, 17, 18, 21, 26, 34, 37 e 39) e o local na sequência de referência (OXA-1 J02967) onde elas estão possivelmente inseridas 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais antibióticos β -lactâmicos	24
Tabela 2	Classificação funcional e molecular das β -lactamases (Modificada por Bush & Jacoby, 2010)	30
Tabela 3	Guia de interpretação do Etest [®] ESBL	51
Tabela 4	Iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>bla</i> e o tamanho esperado do fragmento em pares de base	53
Tabela 5	Condições de ciclagem da reação de PCR para os genes <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{OXA}	54
Tabela 6	Teste de suscetibilidade (Etest) realizado nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL	58
Tabela 7	Bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL identificadas dos pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM (Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2010)	61
Tabela 8	Identificação dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{OXA} no DNA cromossomal e plasmidial das bactérias Gram-negativas	76
Tabela 9	Identificação dos genes codificadores de ESBL nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL pela PCR	77
Tabela 10	Identificação dos genes codificadores de ESBL nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL após o seqüenciamento	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

β	Beta
μM	Micromolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg ou R	Arginina
Asp ou D	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTX	Cefotaxima
CV-I	Cristal-violeta iodo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate
Etest	<i>Epsilometer test</i>
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
Gly ou G	Glicina
Glu ou E	Glutamato
IH	Infecção Hospitalar
kb	Quilobases
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Luria-Bertani
MH	Mueller Hinton
Min	Minuto
OXA	Oxacilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
Ser ou S	Serina
TBE	Tris, EDTA, Ácido bórico e Água
TC	Cefoxitina
TCL	Cefoxitina + ácido clavulânico
TSA	Teste de Suscetibilidade a Antibióticos
TZ	Ceftazidima
TZL	Ceftazidima + ácido clavulânico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Bactérias Gram-negativas	15
1.2. Patogenicidade bacteriana	18
1.3. Infecção hospitalar	20
1.4. Mecanismos de resistência a antibióticos	22
1.5. Antibióticos β -lactâmicos	23
1.6. β -lactamases	26
1.6.1. Classificação fenotípica	27
1.6.2. Classificação molecular	29
1.7. β -lactamase de espectro estendido	31
1.7.1. Definição, histórico e epidemiologia	31
1.7.2. Tipos de ESBL	34
1.7.2.1. ESBL tipo TEM	34
1.7.2.2. ESBL tipo SHV	36
1.7.2.3. ESBL tipo CTX-M	37
1.7.2.4. ESBL tipo OXA	39
1.8. Métodos de detecção	40
1.8.1. Métodos fenotípicos	40
1.8.2. Métodos moleculares	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
3. METODOLOGIA	46
3.1. Delineamento do estudo e amostragem	46
3.2. Critérios de inclusão	46

3.3. Critérios de exclusão	47
3.4. Cultura, isolamento e identificação das bactérias	47
3.5. Teste da β -lactamase	48
3.6. Teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA)	48
3.7. Teste de suscetibilidade para determinação do fenótipo ESBL	49
3.8. Extração do DNA cromossomal e plasmidial	51
3.9. Detecção dos genes <i>bla</i> via PCR	52
3.10. Análise genotípica	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Suscetibilidade antimicrobiana apresentada pelas cepas Gram-negativas estudadas	57
4.2. Detecção e caracterização dos genes <i>bla</i> _{ESBL}	63
4.2.1. Detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM}	64
4.2.2. Detecção dos genes <i>bla</i> _{SHV}	66
4.2.3. Detecção dos genes <i>bla</i> _{CTX-M}	70
4.2.4. Detecção dos genes <i>bla</i> _{OXA}	73
4.2.5. Caracterização dos genes <i>bla</i>	75
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
7. ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias Gram-negativas

As bactérias de interesse médico apresentam diversas formas como cocos, bacilos, espirilos e vibriões e a maioria pode ser classificada de acordo com suas características tintoriais pela coloração de Gram. Por esta técnica, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas e ambas são capazes de reter na parede celular, o cristal violeta, que é o primeiro corante utilizado na técnica (Ministério da Saúde, 2001; Freitas & Picoli, 2007).

As bactérias Gram-positivas, devido à rica quantidade de peptidoglicanos, não se descoram quando tratadas com o agente descolorante alcoólico, isto é, retém o corante inicial e ao final do processo apresentam coloração azul-violeta (roxo) quando observadas ao microscópio. As bactérias Gram-negativas, não conseguem reter o CV-I (complexo cristal-violeta iodo), após o uso do agente descolorante devido à fina camada de peptidoglicano na membrana externa. Assim o CV-I é substituído pelo contracorante safranina (vermelho) que cora as estruturas incolores nestas bactérias (Ministério da Saúde, 2001; Freitas & Picoli, 2007; Pereira & Palomo, 2010).

A parede celular bacteriana (Figura 1) possui afinidade com os corantes da coloração de Gram e também proporciona a proteção, a manutenção da forma bacteriana e a rigidez estrutural. O conhecimento de sua estrutura e composição auxilia na compreensão dos mecanismos de patogenicidade, de ação dos antimicrobianos, entre outros. Nas bactérias Gram-negativas, a parede é mais complexa e delgada, possuindo um espaço periplasmático que contém enzimas degradativas, como β -lactamases; proteínas de ligação, aminoácidos e íons, além de

estar ligada à membrana externa (Winn *et al.*, 2008; Harvey, 2008; Pereira & Palomo, 2010).

A membrana citoplasmática das bactérias Gram-negativas possui uma dupla camada lipídica (Pereira & Palomo, 2010), sendo a interna composta de fosfolipídios e a externa de proteínas (porinas, proteínas de membrana externa e lipoproteínas) e lipopolissacarídeos (LPS). A membrana externa constitui também, uma barreira adicional ao acesso de antibióticos, lisozimas, detergentes, sais biliares e alguns corantes. Outras estruturas encontradas ligadas a membrana externa são os flagelos e fímbrias (pili). Estas últimas são diferentes dos flagelos podendo ser encontradas tanto em espécies móveis como imóveis (Winn *et al.*, 2008; Harvey, 2008). As bactérias Gram-positivas, assim como de Gram-negativas, quando patogênicas, podem apresentar na parede celular, componentes tóxicos que são potenciais fatores associados à virulência destes microorganismos (Wilson *et al.*, 2002).

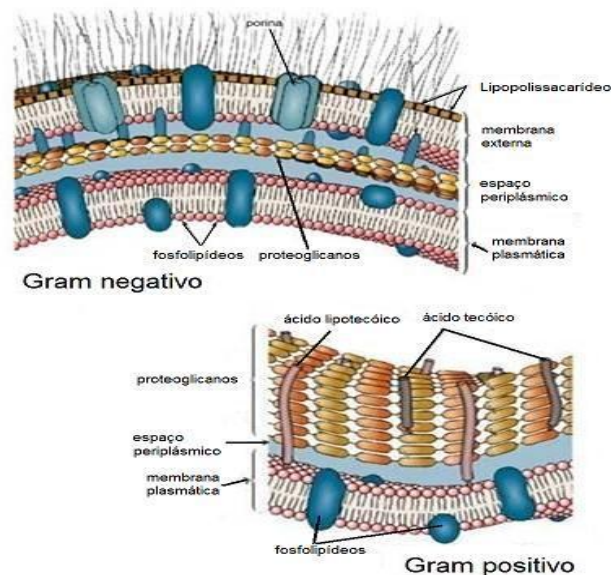


Figura 1 – Ilustração esquemática da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Fonte: <http://flavioehedranbioifef.wordpress.com>).

A família que é considerada a maior, mais heterogênea e a mais importante na área médica entre as bactérias Gram-negativas, é a *Enterobacteriaceae*. As espécies pertencentes a esta família são comumente isoladas de amostras biológicas ou clínicas, mas também são encontradas no trato intestinal de humanos e animais, água, solo e vegetais. Suas características principais são: a fermentação de glicose, a produção de citocromo-oxidase e catalase, a não produção de esporos, a capacidade de reduzir de nitrato a nitrito, havendo variação em sua motilidade e são anaeróbicas facultativas (O'Hara, 2005).

Os gêneros isolados com mais frequência de amostras biológicas desta família são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp (O'Hara, 2005; Winn *et al.*, 2008), sendo que a *E. coli* é um dos muitos patógenos associados à infecções nosocomiais (infecções no trato urinário, sangue, pneumonias, sepse, meningites, etc.), especialmente em pacientes imunocomprometidos (Lim *et al.*, 2009; Superti *et al.*, 2009).

Outra família de importância médica é a *Pseudomonadaceae*, que se caracteriza por apresentar organismos aeróbicos, não fermentadores de glicose, não esporulados, não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degrada através de outras vias metabólicas que não é a fermentação. Estas espécies apresentam reação positiva para citocromo-oxidase e não apresentam crescimento em ágar MacConkey. Os principais gêneros isolados de amostras clínicas são *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia* spp. (Oliveira, 2008). A espécie *P. aeruginosa* é considerada uma das principais preocupações nas infecções hospitalares, incluindo pneumonia, infecções no trato urinário e bacteremia (Jiang *et al.*, 2006).

1.2. Patogenicidade bacteriana

As bactérias capazes de causar doenças são denominadas patógenos e esta capacidade de causar dano ao hospedeiro durante ou após a sua interação com o mesmo é denominada patogenicidade. Quando estas bactérias patogênicas ocasionam doenças em indivíduos saudáveis são classificadas como primárias; e quando causam doenças em indivíduos que apresentem algum tipo de deficiência em suas defesas, seja ela adquirida ou natural, são classificadas como oportunistas. O caráter de patogenicidade bacteriana está associado a fatores de virulência, isto é, ao grau de patogenicidade (Wilson *et al.*, 2002; Baarlen *et al.*, 2007; Gal-Mor & Finlay, 2006). Estes fatores podem ser de:

- **Lesão** (provocam lesão ao organismo):

- **Endotoxinas:** Nas bactérias Gram-negativas, correspondem ao lipopolissacarídeo (LPS – lipídeo A, que é responsável pela patogenicidade e infecções destes patógenos, sendo considerado o maior fator de virulência). Estão associadas ao aparecimento das manifestações clínicas, como coagulação intravascular, choque, febre e inflamação.

- **Enzimas hidrolíticas:** têm-se como exemplo as hialuronidases e proteases, que degradam componentes da matriz extracelular e desorganizam a estrutura dos tecidos.

- **Superantígenos:** são capazes de interagir com moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II e com receptor dos linfócitos, e são produzidas especialmente por bactérias Gram-positivas.

- **Doenças auto-imunes:** Algumas bactérias são capazes de causar doenças auto-imunes quando produzem antígenos semelhantes ao do hospedeiro

ou quando provocam a formação de anticorpos circulantes em altos níveis, que irão interagir com antígenos bacterianos formando complexos antígeno-anticorpo.

- **Exotoxinas:** Podem atuar na membrana citoplasmática (sinalização celular), alterar a permeabilidade da membrana celular e agir dentro da célula (alterando enzimaticamente alvos citosólicos, como por exemplo, a toxina botulínica).

- **Colonização** (capazes de se proliferar e sobreviver no indivíduo):

- **Adesinas:** estruturas que favorecem a adesão das bactérias à superfície das células, são as fímbrias e não-fímbrias. Algumas bactérias formam biofilmes, que são estruturas formadas em diferentes tipos de superfícies celulares do hospedeiro. Constituído por bactérias associadas ou não a outros microrganismos.

- **Invasinas:** são proteínas extracelulares que promovem a invasão (internalização) da bactéria na célula utilizando dois mecanismos – macropinocitose e fagocitose comum.

- **Evasinas:** substâncias que possibilitam a bactéria escapar da fagocitose, sistema complemento e dos anticorpos, como, por exemplo: cápsulas, toxinas e substâncias que promovem a apoptose.

- **Fatores nutricionais:** utilização de nutrientes pela bactéria para se proliferar, particularmente o ferro.

As bactérias potencialmente patogênicas precisam ultrapassar as barreiras existentes no corpo humano, como por exemplo, a pele, tecidos, etc., para poder estabelecer um processo infeccioso. Entretanto, alguns passos são cruciais para o estabelecimento da infecção. Primeiro, o microrganismo necessita penetrar no

hospedeiro, sendo que esta etapa está diretamente ligada à sua adesão à superfície da célula alvo do hospedeiro. Esta adesão é resultante da utilização de fatores de aderência associados à superfície (adesinas) ou do pili, da fimbria, etc., com os receptores existentes na célula alvo. Após ocorrer a invasão bacteriana (capacidade de penetrar nas células ou no tecido do hospedeiro) o microrganismo coloniza os tecidos do hospedeiro, ocorrendo assim à multiplicação destas bactérias e consequentemente, sua disseminação (Baarlen *et al.*, 2007; Winn *et al.*, 2008).

Conseguindo assim, resistir às defesas do hospedeiro e por fim, causar dano fisiológico. Muitos patógenos são capazes de infectar o organismo e dentre eles destacam-se as bactérias Gram-negativas como os patógenos nosocomiais mais isolados (Khorvash *et al.*, 2009). Além disto, é o patógeno Gram-negativo mais adquirido em ambiente hospitalar depois da *E. coli* (Shacheraghi *et al.*, 2009). A taxa de mortalidade para pacientes infectados por bactérias Gram-negativas é de 20 a 30% (Khorvash *et al.*, 2009).

1.3. Infecção hospitalar

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (Portaria nº 2.616, de 12/05/1998), infecção hospitalar (IH) ou nosocomial “é toda infecção adquirida pelo paciente após sua internação no hospital, e as manifestações acontecem durante ou após a internação ou alta, quando estiver relacionada a procedimentos hospitalares”. Os critérios associados ao diagnóstico de uma IH são: observação direta do paciente ou análise do seu prontuário; Resultados provenientes dos exames laboratoriais, como por exemplo, o microbiológico; Quando, após 72 horas de internação apresentar uma infecção, não havendo anteriormente evidências clínicas ou laboratoriais da

mesma; Infecções apresentadas antes de 72 horas de internação quando relacionadas a procedimentos invasivos (Santos *et al.*, 2010).

Os riscos associados às IHS estão diretamente relacionados com a gravidade da doença, as condições nutricionais do paciente, a longos períodos de internação, crianças pequenas, neonatais, idosos, pacientes imunodeprimidos, uso de dispositivos invasivos e baixa imunidade do paciente, tornando-os mais vulneráveis às infecções. Assim, pode-se inferir que o aumento de casos das IH estão diretamente relacionados com a elevação das taxas de morbidade e mortalidade, com altos custos no tratamento, aumento do tempo de internação e ao surgimento de bactérias multirresistentes (Ferreira, 2005; Banderó Filho *et al.*, 2006; Padrão *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 1998) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), as bactérias produtoras de ESBL (β -lactamase de espectro estendido) têm sido as maiores responsáveis pela ocorrência e disseminação mundial da resistência em ambientes hospitalares (Banderó Filho *et al.*, 2006; Padrão *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010), pois são capazes de se estabelecer em ambientes hospitalares, proporcionando surtos ou epidemias. Com isso, há um elevado risco de falha terapêutica e conseqüentemente, ocorre uma diminuição das opções terapêuticas. Além disso, a taxa de morbimortalidade são maiores nas infecções com estes organismos produtores de ESBL (Bhattacharya, 2006; Nogueira, 2006; Dropa *et al.*, 2009; Slama, 2008).

No Brasil e em outros países, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL é maior em ambiente hospitalar, sendo isoladas com mais freqüência de amostras biológicas de pacientes associados a fatores de riscos como: uso inadequado e abusivo de antibióticos, tempo prolongado em unidades de tratamento intensivo

(UTIs), utilização de processos invasivos como cateterismo, intubação pulmonar e doenças severas (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005; Dalmarco, 2006; Romanus *et al.*, 2009). As bactérias Gram-negativas, produtoras ou não de ESBL em especial as enterobactérias, são de grande importância no ambiente hospitalar não apenas por seus fatores de virulência, mas também por apresentarem mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos (Silva, 2006).

1.4. Mecanismos de resistência a antibióticos

Os mecanismos de resistência a antibióticos nas bactérias podem ser expressos nas formas: intrínseca (sendo uma resistência de característica natural e todas as espécies são sempre resistentes) ou adquirida, onde a resistência pode ser obtida por mecanismos genéticos como mutação, processo no qual ocorre uma alteração na seqüência nucleotídica do DNA ocasionando uma alteração da informação genética (Courvalin, 2006; Tenover, 2006; Egervarn, 2009; Mulvey & Simor, 2009).

Os genes de resistência a antibióticos podem estar localizados no DNA cromossomal ou em elementos móveis, como por exemplo, os plasmídeos, que são moléculas acessórias de DNA dupla fita, circulares, extracromossomais, autoreplicativas e de tamanhos variados, podendo ser encontradas no citossol em números variados, sendo facilmente transferidos via horizontal de uma bactéria para outra. Estes, não são essenciais, entretanto, quando presentes conferem às bactérias vantagens seletivas como a resistência a antibióticos ou um metal pesado (Courvalin, 2006; Tenover, 2006; Egervarn, 2009; Mulvey & Simor, 2009).

Os plasmídeos podem transferir genes de resistência em dois momentos celulares: na replicação, também denominada transferência vertical e por

conjugação ou transferência horizontal (o que possibilita a disseminação dos plasmídeos contendo genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou não (Courvalin, 2006; Tenover, 2006; Egervarn, 2009; Mulvey & Simor, 2009). Os plasmídeos que carregam genes codificadores para ESBLs, freqüentemente contém outros genes que possuem resistência a outros antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos, possibilitando o aparecimento de bactérias multirresistentes (Chaudhary & Aggarwal, 2004).

Todavia, importante se faz o conhecimento da fisiologia, farmacologia e biologia molecular das bactérias para melhor se compreender os mecanismos de resistência bacteriana. O mecanismo mais utilizado pelas bactérias Gram-negativas é a produção de enzimas β -lactamases capazes de neutralizar a ação dos antibióticos β -lactâmicos, sendo assim responsáveis por um dos mecanismos mais comuns e representativos de resistência aos antibióticos utilizados na terapia (Livermore, 1995; Souza Jr. *et al.*, 2004, Slama, 2008, Livermore, 2009).

1.5. Antibióticos β -lactâmicos

Dentre os diversos antibióticos existentes, os β -lactâmicos ainda são o grupo de maior utilização na clínica, devido à ausência de toxicidade aos eucariotos por atuarem em alvos específicos (peptidoglicano). Eles caracterizam-se por possuírem na base de sua estrutura o anel β -lactâmico, ligado a um anel de tiazolidina e uma cadeia lateral variável. São agrupados em classes de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação (Livermore, 1995). A hidrólise do anel β -lactâmico pelas enzimas β -lactamases implica em sua inativação (Bush, 1988; Rossi & Andreazzi, 2005; Gupta, 2007). Os principais grupos de antibióticos β -lactâmicos estão descritos na tabela 1.

Outro grupo também importante entre os β -lactâmicos são os **inibidores de β -lactamases** (clavulanato, tazobactam e sulbactam) que são estruturalmente semelhantes as penicilinas, ou seja, contém a estrutura do anel β -lactâmico, entretanto, possuem a cadeia lateral modificada que permite se ligarem de forma irreversível às β -lactamases, mantendo-as inativas, atuando como “suicidas”. Devido a esta característica, esses inibidores têm sido utilizados na antibioterapia associados a um antibiótico β -lactâmico, onde o primeiro irá inativar a enzima enquanto o segundo atua sobre a infecção (Bush, 1988).

Tabela 1 – Principais antibióticos β -lactâmicos.

Classe de β-lactâmico	Subclasse	Antibiótico
Penicilinas naturais	Benzilpenicilina (Penicilina G) Penicilina V	
Penicilinas de amplo espectro	Aminopenicilina Penicilina de 2 ^a geração Carboxipenicilina Penicilinas de 3 ^a geração Ureidopenicilinas Penicilinas de 4 ^a geração	Ampicilina Amoxicilina Carbenicilina Ticarcilina Azlocilina Piperaciclina
Penicilinas semi-sintéticas	Penicilinas estáveis	Oxacilina, meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina
Penicilinas associadas a inibidores de β -lactamases	Ticarcilina/ác. Clavu. piperaciclina/ác.clavu.	Amoxicilina/ác.clavu. Ampicilina/ác. clavu.
Cefalosporinas	1 ^a geração 2 ^a geração 3 ^a geração 4 ^a geração	Cefalotina Cefadroxil Cefuroxima Cafaclos Cefonicida Cefotaxima Ceftrizaxona Ceftazidima Cefepime
Monobactâmico		Aztreonam
Carbapenêmicos		Imipenem Meropenem Ertapenem

Fonte: modificada de Rossi & Andreazzi, 2005.

A estrutura molecular básica de cada grupo de antibióticos β -lactâmico está representada na figura 2 a seguir:

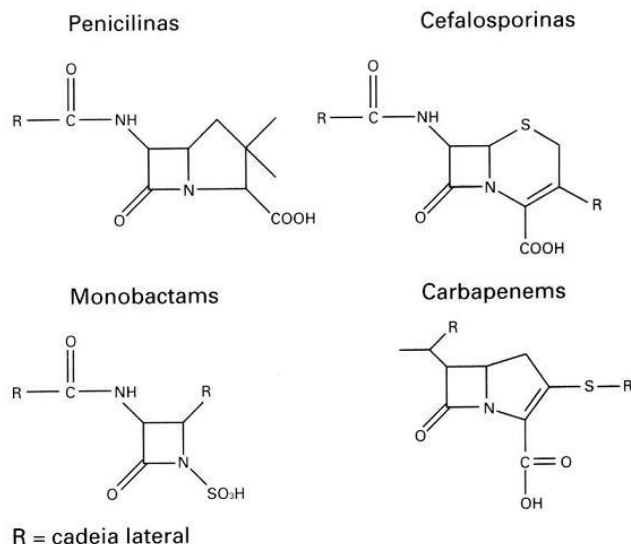


Figura 2 – Estrutura molecular dos grupos de antibióticos β -lactâmicos (Fonte: <http://www.icb.usp.br>).

Atualmente, são descritos três mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos: Alteração do sítio de ligação [alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) – ocorre principalmente nos cocos Gram-positivos e algumas Gram-negativas fastidiosas, como a *Neisseria gonorrhoeae*]; Alteração da permeabilidade da membrana externa (A membrana externa da parede celular bacteriana é uma barreira entre o antibiótico β -lactâmico e o seu alvo de ação. Uma alteração estrutural pode conferir uma resistência a estes antibióticos. Esta impermeabilidade ocorre quando as bactérias não mais produzem porinas, que são canais da membrana externa por onde passam os antibióticos β -lactâmicos); Produção de β -lactamases (Livermore, 1995; Luz, 2008; Shahcheraghi *et al.*, 2009), que será descrito no item seguinte.

1.6. β -lactamases

As β -lactamases são um grupo de enzimas heterogêneas capazes de promover a ruptura do anel β -lactâmico por acilação enzimática (Figura 3) de antibióticos impedindo a síntese da parede bacteriana. Sua atividade irá depender da quantidade de enzima produzida pela bactéria, da capacidade em hidrolisar o anel β -lactâmico e da velocidade em que o antibiótico β -lactâmico atravessa a membrana (Souza Jr. *et al.*, 2004; Gupta, 2007). Nas bactérias Gram-positivas, estas enzimas são excretadas para o meio extracelular, onde exercem sua ação, porém são menos ativas. Nas Gram-negativas estas enzimas localizam-se no espaço periplasmático o que favorece maior concentração e ação frente aos antimicrobianos (Bush, 1988; Bush *et al.*, 1995; Rossi & Andreazzi, 2005).

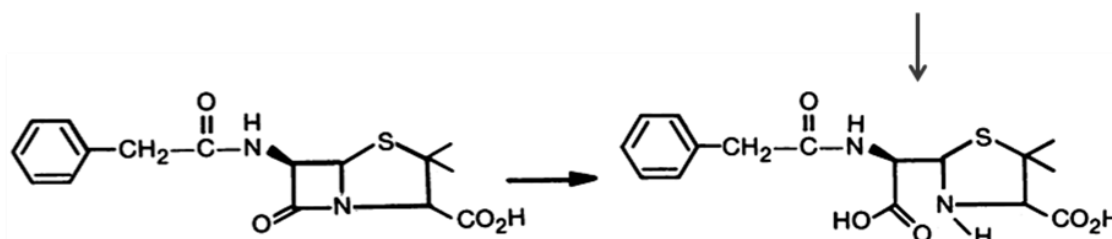


Figura 3 – Desenho esquemático da hidrólise do anel β -lactâmico indicado pela seta (Fonte: Bush *et al.*, 1995).

As β -lactamases podem ser codificadas por genes cromossomais ou plasmidiais e existem diferentes tipos de enzimas (Bush, 1988; Bush *et al.*, 1995; Souza Jr. *et al.*, 2004; Gupta, 2007). Este mecanismo de resistência é o mais comum entre a família *Enterobacteriaceae* (Livermore, 2009), o que traz preocupações, pois as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são os antibióticos preferencialmente escolhidos no tratamento de muitas infecções (Bush &

Jacoby, 2009). A maioria das β -lactamases utiliza o aminoácido serina como co-fator para romper o anel β -lactâmico, outras utilizam zinco (Livermore, 1995; Bradford, 2001; Chaudhary & Aggarwal, 2004).

A primeira β -lactamase foi identificada e isolada em 1940 por Abraham & Chain de uma cepa de *E. coli*, após a liberação da penicilina na prática clínica. Posteriormente, uma enzima β -lactamase codificada por um gene plasmidial foi detectada numa cepa de *E. coli* em Atenas, no ano de 1965, denominada TEM (Temoniera) (Bradford, 2001; Al-Jasser, 2006). Quando ocorre uma mutação em um ou mais aminoácidos destas enzimas numa região estruturalmente crítica, a sua especificidade pode ficar alterada proporcionando o aumento do espectro de ação destas em relação aos antibióticos (Bush *et al.*, 1995; Gupta, 2007).

Devido à grande variedade de tipos de enzimas β -lactamases estas foram divididas em dois esquemas de classificação: funcional e molecular (Patterson *et al.*, 2005).

1.6.1. Classificação Funcional

A primeira classificação funcional das enzimas β -lactamases foi feita por Bush em 1989, na qual foram organizadas de acordo como o substrato de ação e pela suscetibilidade aos inibidores de β -lactamases. Entretanto, em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros acrescentaram subgrupos fenotípicos à classificação anterior, pois observaram um crescente aparecimento de β -lactamases derivadas de TEM e SHV (Suphidryl variable). Esta última classificação, de 1995, é a mais aceita, utilizada atualmente e se divide em quatro grupos e seis subgrupos (Bush *et al.*, 1995; Bradford, 2001, Bush & Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010):

- **Grupo 1:** São as β -lactamases (cefalosporinases) das bactérias Gram-negativas, que não são inibidas pelo ácido clavulânico. Hidrolisam todos os β -lactâmicos com exceção dos carbapenêmicos. Podem ser codificadas por genes cromossomais ou plasmidiais.

- **Grupo 2:** β -lactamases (cefalosporinases, penicilinases) que possuem amplo espectro de ação e geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico (inibidor). São enzimas originárias de mutações ocorridas nos genes TEM e SHV. Este grupo, por possuir diferentes substratos de ação, divide-se em diferentes subgrupos conforme o substrato de ação: **Subgrupo 2a** (penicilinases produzidas por *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. – Gram-positivas); **Subgrupo 2b** (possuem amplo espectro de ação, sendo capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas; Produzidas pelas bactérias Gram-negativas); **Subgrupo 2be** (ESBLs. A letra “e” corresponde à atividade estendida); **Subgrupo 2br** (hidrolisam carbapenêmicos, são resistentes aos inibidores de β -lactamases derivadas de TEM (IRT) e uma enzima derivada de SHV. A letra “r” corresponde à reduzida ação de interação com ácido clavulânico e sulbactam); **Subgrupo 2c** (carbenicilinases); **Subgrupo 2d** (oxacilinases); **Subgrupo 2e** (cefalosporinases que hidrolisam monobactâmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico); **Subgrupo 2f** (carbapenemases inibidas pelo ácido clavulânico).

- **Grupo 3:** Carbapenemases. Pertencem a este grupo as metalo- β -lactamases (tendo como fator de ativação o zinco). Atuam sobre os carbapenêmicos, sendo pouco sensíveis a inibidores β -lactâmicos (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) e não hidrolisam monobactâmicos, contudo são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) – quelante que seqüestra o zinco. Não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e nem sulbactam.

- **Grupo 4:** Composto pelas penicilinas. Não são inibidas pelo ácido clavulânico, não possuem classe molecular e são pouco encontradas.

1.6.2. Classificação molecular

Ambler, em 1980, propôs a primeira classificação molecular das β -lactamases, que apresenta como base a seqüência nucleotídica ou de aminoácidos nestas enzimas. São agrupadas em quatro classes que vão de A a D, sendo os grupos A, C e D denominadas de serino- β -lactamases, por utilizarem serina como co-fator na degradação do anel β -lactâmico; e o grupo B, as metalo- β -lactamase.

Em cada classe molecular são encontrados os grupos descritos por Bush, Jacoby e Medeiros (1995): na classe A estão os grupos funcionais: 2 (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2e e 2f); na classe B encontra-se o grupo 3; na classe C, o grupo 1; e na classe D o subgrupo 2d, do grupo funcional 2 (Tabela 2) (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995, Bush & Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010).

Tabela 2 – Classificação funcional e molecular das β -lactamases (Modificada por Bush & Jacoby, 2010).

Classe Funcional Bush-Jacoby (2010)	Classe funcional Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe molecular Ambler (1980)	Substrato preferido	Enzimas representantes
1	1	C	Cefalosporinas	AmpC
1e	NI	C	Cefalosporinas	
2a	2a	A	Penicilinas	Penicilinases de Gram-positivas
2b	2b	A	Penicilinas; Cefalosporinas 1 ^a geração	TEM-1; TEM-2; SHV-1
2be	2be	A	Penicilinas; Cefalosporinas (espectro estendido); Monobactâmicos	TEM-3 a TEM-26; SHV-2 a SHV-6, CTX-M-15
2br	2br	A	Penicilinas	TEM-30 a TEM-36
2ber	NI	A	Monobactâmicos e cefalosporinas (espectro estendido)	TEM-50
2c	2c	A	Penicilinas, carbapenêmicos	PSE-1; PSE-3; PSE-4
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	RTG-4
2d	2d	D	Penicilinas; Cloxacilinas	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas (espectro estendido), Carbapenêmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicos	OXA-23, OXA-18
2e	2e	A	Cefalosporinas (espectro estendido)	CepA
2f	2f	A	Penicilinas; Cefalosporinas; Carbapenêmicos	KPC-2
3a	3	B (B1)	Carbapenêmicos	IMP-1
		B (B3)		FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenêmicos	CphA
NI	4	Não conhecida	Penicilinas	Penicilinases de <i>B. cepacia</i>

Legenda: NI = Não incluída; e = extensão; r = resistência; IRT = Inibidor-Resistente de TEM.

Entre as serino- β -lactamases, destacam-se as enzimas ESBL que são capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (oximino-cefalosporinas), como cefuroxima, cefotaxima e ceftazidima, e monobactâmicos. Entretanto, são inibidas pelo ácido clavulânico e não atuam em cefamicinas e carbapenêmicos. Pertencem à classe molecular “A” de Ambler. (Sanders & Sanders, 1992 **apud**

Dalmarco *et al.*, 2006; Bush *et al.*, 1995; Schwaber *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Carneiro, 2008).

1.7. β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

1.7.1. Definição, histórico e epidemiologia

A primeira bactéria isolada de amostra clínica que apresentou fenótipo positivo para ESBL foi detectada na Alemanha por Knothe em 1983, na bactéria *Klebsiella ozaenae* (Bush *et al.*, 1995; Dalmarco *et al.*, 2006; Carneiro, 2008) que possuía a β -lactamase SHV-2. Em 1985, ocorreu na França o primeiro surto de infecção hospitalar ocasionado por bactérias produtoras de ESBLs. O fator considerado primordial para direcionar a evolução das EBLs seria o uso intenso de oximino-cefalosporinas, devido à pressão seletiva (Chaudhary & Aggarwal, 2004; Tasli & Bahar, 2005; Silva, 2006; Augusti *et al.*, 2007; Feizabadi *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; CLSI, 2010).

Todavia, tal fato não pode explicar todo o fenômeno da evolução e epidemiologia das ESBLs, uma vez que esta resistência pode ser transferida via plasmídeos (figura 4), assim como podem surgir por mutações ao acaso na seqüência nucleotídica possibilitando a ampliação do espectro de ação das β -lactamases clássicas (Chaudhary & Aggarwal, 2004; Tasli & Bahar, 2005; Silva, 2006; Augusti *et al.*, 2007; Feizabadi *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; CLSI, 2010).

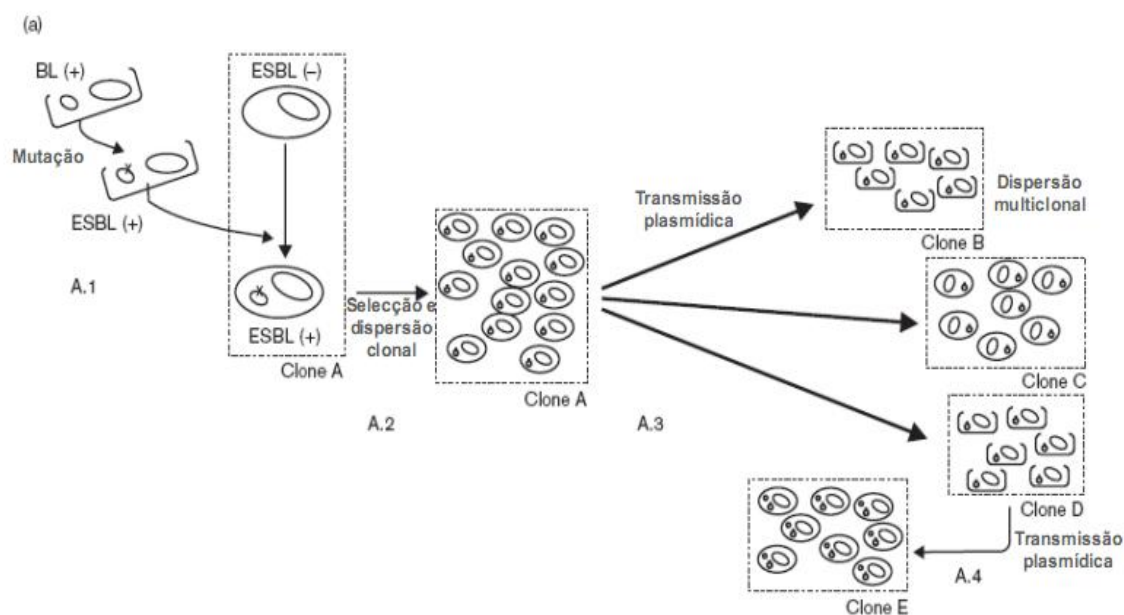


Figura 4 – Desenho esquemático da propagação clonal e modelo de disseminação plasmídica. A.1: Surgimento de uma ESBL devido a uma mutação ocorrida em um gene *bla* situado num plasmídeo pré-existente; A.2: Aquisição do plasmídeo contendo o gene *bla* pelo clone A e propagação devido à seleção e a dispersão clonal; A.3: Transmissão do plasmídeo e disseminação em diferentes clones (B e D) contendo o plasmídeo com gene para ESBL; A.4: Transmissão plasmídica do gene *bla* para outro clone (E) contendo outro plasmídeo de resistência (Fonte: Cantón *et al.*, 2006).

A grande maioria das cepas produtoras de ESBL pertence à família *Enterobacteriaceae* e são freqüentemente identificadas em amostras clínicas e comunitárias (Coque *et al.*, 2008). Destacam-se nesta família as espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* como as maiores produtoras (Bradford, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Lal *et al.*, 2007; Kiratisin *et al.*, 2008; Romanus, 2009). Contudo, estas enzimas também têm sido encontradas em menor freqüência em outros patógenos de importância clínica como: *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Morganella* spp., *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia cepacia*. Porém, a freqüência de produção nestes organismos é baixa (Bradford, 2001; Chaudhary & Aggarwal, 2004; Rossi e Andreazzi, 2005; Al-Jasser, 2006; Romanus *et al.*, 2009).

A prevalência de *K. pneumoniae* e *E. coli*, em 1999, resistentes às cefalosporinas de 3ª geração chegou a 8,9% e 3,2% respectivamente, nos EUA; na América Latina, foi de 45,4% de *K. pneumoniae* e 8,5% de *E. coli*. Em países como Portugal, Grécia, Suíça, Holanda, Alemanha e Egito a distribuição das bactérias produtoras de ESBLs é de 34%, 27,4%, 3-8%, 2%, 2,6% e 38,5%, respectivamente (Bradford, 2001; Mulvey *et al.*, 2004; Al-Zarouni *et al.*, 2008, Augusti *et al.*, 2007, Kiratishi *et al.*, 2008). Coque e cols. (2008) apresentaram dados obtidos de comparações entre a Europa e outras regiões geográficas, demonstrando que as ESBLs eram menos freqüentes na Europa, América Latina e Ásia, porém, mais comuns na América do Norte e Sul (Figura 5).

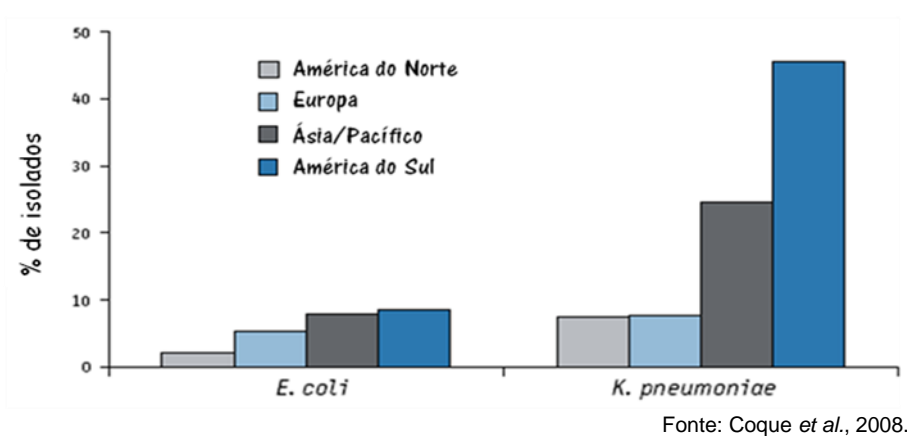


Figura 5 – Frequência em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (2004-2006) em diferentes regiões geográficas (Fonte: Coque *et al.* 2008).

No Brasil, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL chegou a 65% e 45% para *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente, sendo considerada uma das mais altas do mundo em 2004 (Mulvey *et al.*, 2004). Outras pesquisas realizadas em hospitais de Porto Alegre (Freitas *et al.*, 2003) demonstraram que a prevalência de

K. pneumoniae e *E. coli* produtoras de ESBL foi de 70% e 59%, respectivamente. Em Curitiba (Nogueira *et al.*, 2006) a prevalência foi de 57,45% em *K. pneumoniae* e de 7,2% para *E. coli*. Em São Paulo (Dropa *et al.*, 2006) foi de 71,9% e 13,3% para *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente. E em Rio grande do Sul (Lago *et al.*, 2010) a prevalência foi de 46,2% para *E. coli* e 2,4% para *K. pneumoniae*.

1.7.2. Tipos de ESBLs

Os tipos de ESBLs podem variar entre regiões geográficas e hospitais (Du *et al.*, 2002; Kiratishi *et al.*, 2008) e os mais isolados nos anos 90 foram os tipos TEM e SHV, e raramente as CTX-M (Cantón *et al.*, 2006). A espécie *K. pneumoniae* era considerada o maior reservatório de genes *bla* associados às enzimas ESBL (Paterson *et al.*, 2005). Contudo, no cenário atual, este padrão tem mudado drasticamente, sendo que a variante CTX-M está substituindo a TEM e SHV, e a *E. coli*. Tornou-se uma das bactérias mais associadas à produção de ESBL (Cantón *et al.*, 2008; Livermore, 2009; Ruppé *et al.*, 2009). Atualmente, a maioria destas enzimas pertence às famílias do tipo TEM, SHV e CTX-M (Livermore *et al.*, 2008) e existe uma grande variedade de tipos de ESBL: 185 tipos de TEM, 140 de SHV, 113 de CTX-M e 209 de OXA ([http://www.lahey.org/studies/web,htm](http://www.lahey.org/studies/web.htm). Consulta em abril de 2011).

1.7.2.1. ESBL tipo TEM

Trata-se de um vasto grupo de enzimas β -lactamases de espectro estendido derivadas de mutações pontuais nas β -lactamases TEM-1 e TEM-2, codificadas por genes plasmidiais, e são frequentemente encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, e com menor frequência *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus*

mirabilis, *Salmonella* spp. e em bactérias não fermentadoras, como *P. aeruginosa* (Livermore, 1995; Bradford, 2001; Sabra *et al.*, 2009).

São capazes de hidrolisar cefalosporinas de 3ª geração, degradando mais eficazmente ceftazidima, sendo por isso também conhecidas como ceftazidimases. Não demonstram resistência ao ácido clavulânico (Paterson *et al.*, 2003; Al-Jasser, 2006). As enzimas do tipo TEM-1 hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. A TEM-2 é a primeira derivação da TEM-1 e possuem apenas um aminoácido substituído, na posição 39 (Glutamina por Lisina) o que não causa alteração no antibiótico alvo de ação da enzima. O tipo TEM-3 foi descrito em 1989 como a primeira β -lactamase relacionada com o fenótipo ESBL. A família TEM tornou-se a mais abundante dos tipos de ESBL (Bradford, 2001; Livermore, 2009). As substituições aminoacídicas ocorrem em um número limitado de posições, onde algumas resultam em alterações sutis nos fenótipos das ESBL e, conseqüentemente, nos substratos de ação (Figura 6) (Bradford, 2001; Livermore, 2009).

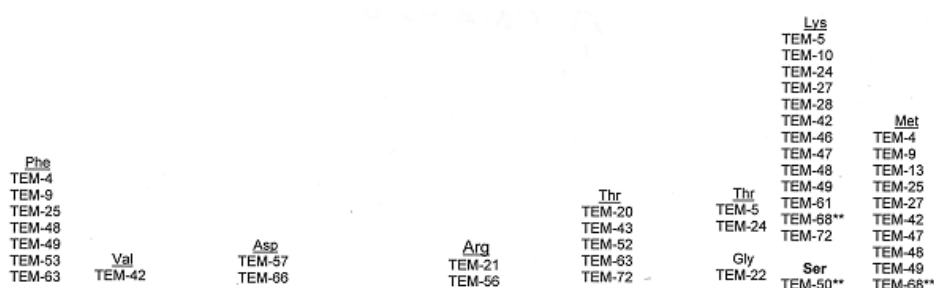


Figura 6 – Substituições dos aminoácidos em derivados de ESBL tipo TEM. Os aminoácidos em destaque (cinza) são encontrados no gene para β -lactamase TEM-1 (**círculos**: Alterações importantes para produção do fenótipo ESBL) (Fonte:Bradford, 2001).

1.7.2.2. ESBL tipo SHV

Outra β -lactamase comumente mediada por plasmídeos é a SHV-1, sendo responsável por 20% das transmissões plasmidiais que conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido (Silva, 2006). A maioria das enzimas ESBL tipo SHV é caracterizada pela substituição no gene *bla_{SHV}* na posição 238 de uma glicina por serina (Gly238Ser), enquanto outras apresentam substituição de glutamato por lisina na posição 240 (Glu240Lys) (Bradford, 2001).

É interessante observar que ambas as substituições Gly238Ser e Glu240Lys assemelham-se as que acontecem com as ESBLs do tipo TEM. Estas alterações comprometem a eficácia de hidrólise de ceftazidima e cefotaxima, respectivamente. Nota-se que estas mutações são semelhantes as que ocorrem na família ESBL tipo TEM (Bradford, 2001; Al-Jasser, 2006; Hammond, 2008). Possuem habilidade de

hidrolisar penicilinas (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005). São predominantes nas Enterobactérias, especialmente na espécie *K. pneumoniae*, todavia tem sido descritas em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *C. diversus* e *E. coli*. Diferentemente do tipo TEM, existem poucas variantes (Figura 7) de SHV-1 (Bradford, 2001; Al-Jasser, 2006; Hammond, 2008).

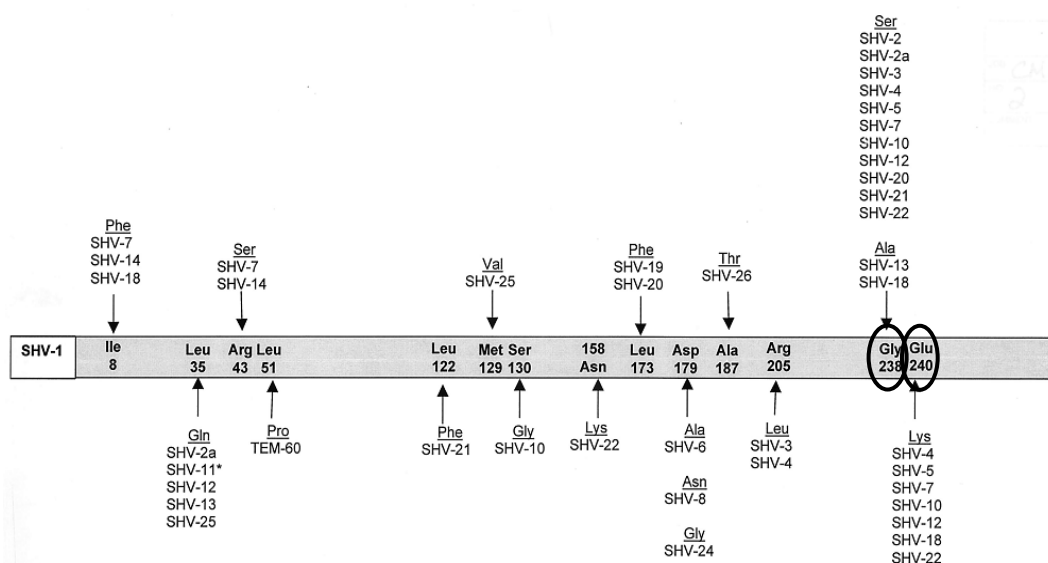


Figura 7 – Substituições dos aminoácidos em derivados de ESBL tipo SHV. Os aminoácidos em destaque (cinza) são encontrados no gene para β -lactamase SHV-1 (círculos: principais mutações para o fenótipo ESBL). *SHV-11 não é ESBL (Fonte: Bradford, 2001).

1.7.2.3. ESBL tipo CTX-M

A família CTX-M também é mediada por genes plasmidiais (Bertrand *et al.*, 2006). Foi primeiramente descrita em 1992 na Alemanha (CTX-M-1) (Bauernfeid *et al.*, 1992 **apud** Kiratisin *et al.*, 2008). A maioria das enzimas CTX-M possuem perfis de hidrólises similares. Caracterizam-se por hidrolisar cefotaxima com mais eficácia, comparada a ceftazidima, o que conferiu a elas esta denominação. Também hidrolisam com maior eficácia cefalotina do que a benzilpenicilina e cefepime (Al-Jasser, 2006). Entretanto, algumas variações destas enzimas hidrolisam

eficazmente ceftazidima (Bonnet, 2004; Livermore, 2009). Um exemplo disso é a CTX-M-15, que é a mais disseminada pelo mundo (Cantón *et al.*, 2006; Livermore, 2009).

São inibidas com mais eficiência por tazobactam do que por sulbactam e clavulanato (Bush *et al.*, 1993, Bonnet, 2004). Pesquisas indicam que o resíduo de serina na posição 237, que está presente em todas as enzimas CTX-M, tem importante papel na atividade de espectro estendido, e que a alteração da arginina (Arg) na posição 276 tem destaque na hidrólise de cefalosporinas de 3ª geração (Bradford, 2001; Paterson *et al.*, 2005).

Possuem apenas 40% de semelhança com as enzimas TEM e SHV, porém, possuem origem evolutiva diferente. Estudos filogenéticos, baseados na similaridade da seqüência de aminoácidos mostram que existem grupos das enzimas CTX-M subdivididos em cinco: **CTX-M-1**: Incluem as enzimas CTX-M-3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1; **CTX-M-2**: Enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31, -44; **CTX-M-8**: Enzimas CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63; **CTX-M-9**: Enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16a -19, -21, -27, -45, -46, -47, -48, -49 e -50; **CTX-M-25**: Enzimas CTX-M-25, -26, -39 e -41 (Bonnet *et al.*, 2004; Tolentino, 2009).

É considerada uma família de rápido crescimento e tornou-se, nos últimos anos, o tipo mais prevalente, principalmente na Europa e em determinados países da América do Sul (Coque, 2008). Também têm sido isoladas em muitos países como África, Ásia e Europa (Al-Jasser, 2006; Kingsley e Verghese, 2008), existindo mais de 60 variantes em diferentes espécies de Enterobactérias, como *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (Bradford *et al.*, 1998 *apud* Al-Jasser, 2006). Atualmente são prevalentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*

(Mendonça *et al.*, 2007; Luz, 2008) e apresentam capacidade de disseminação fora do ambiente hospitalar, justificando seu perfil pandêmico, devido ao reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos móveis que carregam genes *bla*_{CTX-M} e sua elevada prevalência em comunidades (Livermore, 2009).

1.7.2.4. ESBL tipo OXA

A definição de ESBL normalmente restringe-se às enzimas de classe "A". Entretanto, também pode incluir oxacilinases como ESBLs tipo OXA. Assim como a ESBL tipo CTX-M, a OXA é uma família que tem crescido entre as ESBLs que diferem da TEM e SHV por pertencerem à classe molecular D e grupo funcional 2d (Bradford, 2001). Conferem resistência a ampicilina e cefalotina e são designadas de OXA devido à sua grande capacidade de hidrolisar a oxacilina e cloxacilina, todavia são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (Bush *et al.*, 1995, Bradford, 2001; Bhattacharjee *et al.*, 2007).

O primeiro relato desta enzima ocorreu num hospital em Ankara (Turquia), tendo sido isolada da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, sendo frequente nesta espécie. Entretanto, também têm sido detectada em membros da família *Enterobacteriaceae*. Posteriormente, foram encontradas com maior frequência em outras bactérias desta mesma família (Hall *et al.*, 1993; Bradford, 2001). E assim como as ESBLs TEM e SHV, as do tipo OXA parecem ter evoluído de enzimas progenitoras de espectro mais reduzido como OXA-10, OXA-13 e OXA-2, entretanto poucos estudos relacionados à epidemiologia e distribuição geográficas das ESBL tipo OXA foram realizados (Bhattacharjee *et al.*, 2007).

Embora a maioria das variantes de OXA esteja associada à OXA-10, as variações relacionadas às ESBLs possuem apenas uma ou duas substituições de

aminoácidos: um aspartato (Asp) por uma serina (Ser) na posição 73 ou um aspartato (Asp) por uma glicina (Gly) na posição 157, porém, a substituição Gly157Asp ocasiona a extensão da resistência a ceftazidima. Algumas variantes de OXA, como por exemplo, a OXA-1, é capaz de hidrolisar cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (Paterson *et al.*, 2005).

1.8. Métodos de detecção

A detecção e identificação de bactérias produtoras de ESBLs em isolados clínicos são de crucial importância devido às implicações terapêuticas e para o controle epidemiológico e infeccioso (Al-Jasser, 2006, CLSI, 2010). Logo, os dados obtidos favorecem aos programas de vigilância identificar os determinantes genéticos de resistência, principalmente quando perfis de resistência não usuais são observados. Com a elevação da prevalência de ESBL nas Enterobactérias e suas características específicas, tornou-se necessário a utilização de métodos mais eficazes para a detecção e identificação das mesmas (Bradford, 2001, Rossi & Andreazzi, 2005). Existem dois testes para detecção das ESBL: fenotípicos e moleculares.

1.8.1. Métodos fenotípicos

A detecção fenotípica é realizada utilizando-se métodos de triagem e confirmação da presença ou ausência de enzimas. Muitos são os testes disponíveis para a identificação *in vitro* das bactérias produtoras de ESBLs (Bradford, 2001; CLSI, 2005; Nogueira, 2006; Rossi e Andreazzi, 2006). O CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) recomenda que sejam realizados testes de triagem e

confirmatórios para detectar a produção de ESBL utilizando os seguintes antibióticos: cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima ou ceftriaxona.

Para o teste confirmatório do fenótipo, recomenda-se a utilização de cefotaxima e ceftazidima em combinação com ácido clavulânico contra o seu halo testado individualmente. Também se faz necessário a utilização da cepa *K. pneumoniae* ATCC® 700603, que é uma bactéria já caracterizada como produtora de ESBL como controle positivo para os teste de ESBL. Entretanto, estes testes são padronizados para quatro espécies bacterianas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *Proteus* sp., existindo dificuldade de interpretação dos resultados (Dalmarco *et al.*, 2006; CLSI, 2010).

A identificação fenotípica de cepas produtoras de ESBL pode ser de difícil detecção, pois estas enzimas possuem diferentes níveis de atividades contra várias cefalosporinas, apresentando resistência clínica a estes antibióticos, mesmo não sendo detectadas *in vitro*. Assim, quando uma cepa é detectada como possível produtora de ESBL, esta deve ser relatada como resistente a todas as cefalosporinas e ao aztreonam, pois para os pacientes que apresentam infecções causadas por estas bactérias, o risco de falha terapêutica com os antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro é maior. Os testes mais utilizados são:

- **Duplo-Disco Difusão (DDS):** teste de triagem (quando não associado ao inibidor) que consiste na aplicação em placa contendo ágar Muller Hinton (MH) de discos de cefpodoxima (10 μ g) ou ceftazidima (30 μ g) ou cefotaxima (30 μ g) ou ceftriaxona (30 μ g) ou aztreonam (30 μ g). Quando o halo apresentar pontos de corte ≤ 17 mm ou ≤ 22 mm ou ≤ 27 mm ou ≤ 25 mm ou ≤ 27 mm respectivamente, pode indicar a produção de ESBL. O teste confirmatório é feito utilizando disco de cefotaxima (30 μ g), associados ao inibidor: cefotaxima-ácido clavulânico (30/10 μ g) e

ceftazidima (30 μ g), ceftazidima-ácido clavulânico (30/10 μ g) (os valores das concentrações dos discos utilizados são recomendações padrões a serem seguidas para disco difusão).

- **Etest (*Epsilon*meter test):** teste de triagem para ESBL. É uma técnica qualitativa e quantitativa, pois possibilita a determinação do CIM (Concentração Inibitória Mínima) a partir de um gradiente de antibiótico pré-definido. O CLSI (2005) determina que a diminuição da suscetibilidade a alguns antibióticos β -lactâmicos pode indicar a produção de ESBL, assim, cepas que apresentarem CIM ≥ 2 (ponto de corte para triagem de ESBL) para ceftriaxona, ceftazidima (TZ), aztreonam, cefpodoxima ou cefotaxima (CT) deve ser considerada como possível produtora de ESBL.

- **Etest ESBL:** É um teste confirmatório baseado na inibição das enzimas ESBL *in vitro* pelo ácido clavulânico. São utilizadas fitas contendo em um lado gradiente de antibiótico (ceftazidima ou cefotaxima) e na outra extremidade o mesmo antibiótico associados ao inibidor, ácido clavulânico (CT/CTL ou TZ/TZL) numa concentração fixa de 2 μ g/mL. Assim, torna-se possível identificar o CIM apenas do antibiótico e em associação ao inibidor. Quando a razão entre ceftazidima e cefotaxima mais ácido clavulânico for ≥ 8 , possivelmente a bactéria é produtora de ESBL.

- **Vitek[®] ESBL:** Sistema automatizado de identificação e/ou teste de suscetibilidade. O resultado do teste é expresso em valores de CIM, sendo interpretado como sensível, sensibilidade reduzida e resistência de acordo com o CLSI. Este teste é capaz de identificar a produção de ESBL por uma versão automatizada de testes de sinergia, baseado no efeito inibitório do ácido clavulânico

associado à cefotaxima ou ceftazidima. Interpreta-se o resultado pela medição da diferença de crescimento com ou sem o inibidor (Dashti *et al.*, 2006).

1.8.2. Técnicas moleculares

Os testes fenotípicos possibilitam a detecção da enzima, mas não sua identificação (Bradford, 2001). Portanto, as técnicas moleculares auxiliam na diferenciação e identificação de ESBLs, sendo consideradas de extrema importância para sua identificação. A técnica molecular simples e mais utilizada é a PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) (Shah *et al.*, 2004) que utiliza pares de iniciadores específicos para os genes de β -lactamase, a fim de se amplificar a região de interesse (Bradford, 2001; Oliveira, 2008), ou seja, permite detectar a presença das β -lactamases e em que família esta pertence (Bradford, 2001).

Entretanto, esta técnica não permite a diferenciação entre os grupos de ESBL (ex. CTX-M-15, TEM-1, OXA-2, dentre outros), sendo necessária a realização do seqüenciamento (método padrão) para a discriminação das variantes que é um processo para determinar a ordem dos nucleotídeos em uma amostra permitindo a distinção entre cepas de um mesmo clone e as mutações pontuais responsáveis pela resistência específica a um antibiótico, no caso das bactérias produtoras de ESBLs, aos β -lactâmicos (Tosin *et al.*, 2003; Tolentino, 2009).

A determinação da seqüência nucleotídica é considerada padrão ouro para a identificação específica do gene para β -lactamase presente na cepa (Bradford, 2001; Tasli e Bahar, 2005; Al-Jasser, 2006; Oliveira, 2008). Logo, as técnicas moleculares permitem a compreensão dos mecanismos de resistência bacteriana, além de possibilitar o conhecimento de qual enzima ESBL é a mais prevalente em uma

determinada região, fornecendo assim dados importantes a nível epidemiológico (Oliveira, 2008).

Dessa forma, além dos motivos citados no decorrer deste trabalho e ao fato, principalmente, de não existirem na região Norte, em especial no Estado do Amazonas, na cidade de Manaus dados moleculares referentes aos genes e aos tipos de ESBL existentes nestas bactérias produtoras de ESBL. A realização desta pesquisa busca detectar estes genes a fim de gerar dados que colaborem na elaboração de futuros programas de vigilância, monitoramento, além de auxiliar na diminuição dos riscos de infecções causadas por estas bactérias produtoras de ESBL.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Detectar os genes relacionados à produção de ESBL de bactérias Gram-negativas isoladas das amostras clínicas de pacientes da Fundação HEMOAM.

2.2. ESPECÍFICOS

- Verificar a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} em amostras clínicas.
- Identificar a presença de subgrupos das famílias TEM, SHV, CTX-M e OXA.
- Pesquisar a localização genética (plasmídeo ou cromossomo) dos genes estudados.

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento do estudo e amostragem

Estudo transversal, descritivo, realizado com isolados obtidos a partir do projeto intitulado “Prevalência, sensibilidade a antibióticos e caracterização genética das bactérias isoladas de processos infecciosos de pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM”, aprovado pelo CEP da Fundação HEMOAM, sob o número CAAE-0005.0.112.000-06. O projeto atual recebeu aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) tendo como CAAE o nº 0306.0.115.000-09 (anexo 1).

A coleta foi realizada no período de Julho/2006 a agosto/2007 e obteve-se 146 amostras clínicas provenientes de vários sítios biológicos (sangue, urina, fezes, escarro, secreções de orofaringe, secreção perianal, feridas e abscesso dentário), de onde foram isoladas 44 cepas, sendo 17 Gram-negativas (12 ESBL positivas – utilizadas nesta pesquisa –, 4 ESBL negativas e 1 ESBL não determinada) e 27 Gram-positivas.

Todas as bactérias foram armazenadas em meios líquidos *Brain Heart Infusion* (BHI) e Cístina tripticase soja (CTS) com 10% de glicerol a -70°C no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) na Fundação HEMOAM para realização de estudos posteriores.

3.2. Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo todas as bactérias Gram-negativas cujo teste de sensibilidade para detecção da enzima β -lactamase (ESBL) foi considerado positivo.

3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos (as) do projeto:

- Cepas que não cresceram no repique;
- Isolados com contaminação por microorganismos que não foram de interesse da pesquisa;
- Bactérias nas quais não foram detectados plasmídeos e nem DNA cromossomal após aplicação protocolo de extração correspondente.

3.4. Cultura, Isolamento e identificação das bactérias

As cepas foram previamente isoladas a partir de amostras clínicas, semeadas em meios de isolamento primário como ágar sangue de carneiro a 5%, ágar eosina azul de metileno (EMB), ágar Mac Conkey, ágar manitol salgado e Mueller Hinton (Himedia[®]), seguido de incubação em estufa bacteriológica de 35°C por um período de 24/48 horas.

Após o crescimento microbiano, as bactérias foram classificadas como Gram-negativas pela técnica de coloração de Gram, e foram submetidas a testes de identificação de gênero e espécie. Para as Enterobactérias utilizaram-se os kits Enterokit B e C (Probac do Brasil, São Paulo[®]) e EPM-Mili-Citrato (Probac do Brasil, São Paulo[®]), seguido de testes bioquímicos adicionais: oxidase (negativo para Enterobactérias); urease; teste de descarboxilação da lisina; teste de motilidade utilizando meio de MIO (Motilidade, Indol, Ornitina); teste para detecção da produção de sulfato de hidrogênio com o meio de TSI (Triplíce-ferro-açúcar); fermentação de glicose, maltose, sacarose e lactose (Himedia[®]). Para as não-fermentadoras, realizou-se o teste da oxidase para identificação de gênero e espécie utilizando-se o

kit NF II (não fermentadoras). Os procedimentos acima foram realizados conforme protocolos padronizados (Probac do Brasil[®], São Paulo).

3.5. Teste da β -lactamase

O teste da β -lactamase foi realizado para as 17 bactérias Gram-negativas para se determinar a produção da enzima β -lactamase, a fim de se fazer uma primeira triagem com relação à produção desta enzima e, conseqüentemente, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. É um teste rápido e qualitativo que consiste na aplicação de uma pequena quantidade do inóculo bacteriano em um disco impregnado com cefalosporina cromogênica (*Cefinase plus* - Becton, Dickinson and Company, USA, BD). A mudança de coloração para rosa (indica que houve a liberação de um radical cromogênico e, conseqüentemente, a hidrólise do anel β -lactâmico pela ação da β -lactamase).

3.6. Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA)

O teste de suscetibilidade antimicrobiana utilizado foi o Etest[®] (AB BIODISK, Solna, Suécia) para verificar a sensibilidade, intermediário e a resistência aos antibióticos utilizados na rotina terapêutica, que foram escolhidos de acordo com o corpo clínico da Fundação HEMOAM. Os antibióticos utilizados com suas respectivas concentrações foram: Tetraciclina (0,016-256 μ g/mL), Ciprofloxacina (0,002-32 μ g/mL), Imipenem (0,002-32 μ g/mL), Ceftazidima (0,016-256 μ g/mL), Cefoxitina (0,016-256 μ g/mL), Cloranfenicol (0,016-256 μ g/mL), Cefepime (0,016-256 μ g/mL) e Amicacina (0,016-256 μ g/mL). Os valores utilizados para identificar se a cepa apresentava sensibilidade, sensibilidade reduzida ou resistência foram respectivamente: ≤ 1 , 2 e ≥ 4 para ciprofloxacina; ≤ 8 , 16 e ≥ 32 para cefoxitina,

cefepime, ceftazidima e cloranfenicol; ≤ 4 , 8 e ≥ 16 para imipenem e tetraciclina; ≤ 16 , 32 e ≥ 64 para amicacina.

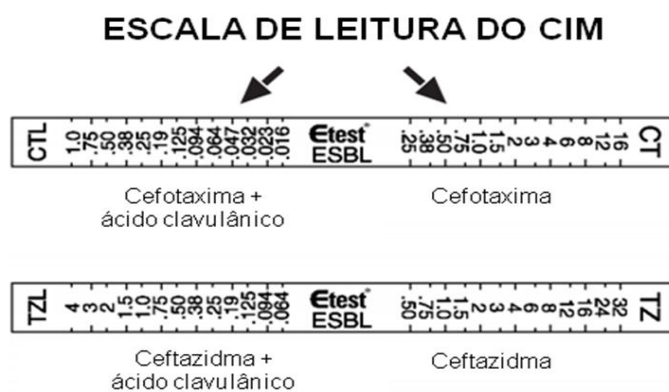
O princípio do teste baseia-se na coleta de uma colônia pura do meio de cultura MH, preparando-se uma suspensão em salina estéril (NaCl 0,8%) com turbidez correspondente a 0.5 do padrão de McFarland (o que equivale a aproximadamente 10^8 UFC/mL). Após a homogeneização, a mesma foi semeada por esgotamento na superfície do meio MH com o auxílio de um *swab*. Em seguida foram aplicadas fitas plásticas não porosas contendo o antibiótico distribuído em uma escala de CIM em $\mu\text{g/mL}$ as placas e incubadas em estufa a 35°C . Após 24 horas observou-se a elipse de suscetibilidade ou de resistência ao antibiótico. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos antibióticos utilizados no teste.

3.7. Teste de suscetibilidade para determinação da enzima ESBL

Para verificar e confirmar a produção da enzima ESBL *in vitro*, as bactérias Gram-negativas foram primeiramente semeadas em ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 35°C por 16-20 horas. Em seguida, retirou-se uma colônia pura e preparou-se uma suspensão em solução salina (NaCl 0,8%) com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Com o auxílio de um *swab* estéril, inoculou-se as bactérias em meio de cultura MH a 35°C por 16-20 horas, conforme o protocolo padronizado pelo fabricante (Etest[®] ESBL, AB BIODISK, Suécia).

Foram utilizadas duas fitas plásticas, não porosas, uma contendo um gradiente crescente em $\mu\text{g/mL}$ para o antibiótico cefotaxima (CT) com escala de 0,25-16 $\mu\text{g/mL}$ em uma das extremidades e na outra, gradiente pré-definido de CTL (cefotaxima + ácido clavulânico) com concentrações crescentes de CT escala de

0,016-1 μ g/mL, associadas a uma concentração fixa de ácido clavulânico (4 μ g/mL). A segunda fita continha também um gradiente crescente em μ g/mL para ceftazidima (TZ) com escala de 0,50-32 μ g/mL num lado da fita e no outro lado, um gradiente predefinido TZL (ceftazidima + ácido clavulânico) com 0,064-4 μ g/mL associada a uma concentração fixa de 4 μ g/mL de ácido clavulânico como demonstrado na figura 8.



Fonte: AB BIODISK.

Figura 8 – Fitas utilizadas na realização do Etest[®] ESBL com os gradientes de concentrações dos antibióticos CT e TZ com e sem associação ao ácido clavulânico.

A amostra foi considerada positiva (produtora de ESBL) quando houve a redução da CIM de ceftazidima ou cefotaxima \geq a 3 diluições logarítmicas na presença de ácido clavulânico em comparação com a CIM de ceftazidima/cefotaxima sem o mesmo, ou seja, quando a razão entre a CIM do antibiótico testado e a CIM do antimicrobiano associado ao ácido clavulânico for \geq 8. Outra condição para se considerar uma amostra como produtora de ESBL foi o aparecimento da zona fantasma (*phantom zone*) ou determinada pela deformação da elipse do lado contendo CT ou TZ. O resultado foi considerado como negativo

quando ambas as CIMs apresentaram valores abaixo dos gradientes de CT e TZ apresentados na fita. E quando ambas as CIMs encontravam-se acima da escala de leitura da fita impossibilitando o cálculo, o resultado foi considerado indeterminado (Tabela 3).

Das 17 bactérias Gram-negativas obtidas do projeto anteriormente citado, 12 foram ESBL positivas, quatro negativas e uma foi considerada como não determinada.

As cepas utilizadas como controle positivo e negativo do teste foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram: *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, respectivamente (CLSI, 2005).

Tabela 3 – Guia para interpretação do Etest® ESBL.

ESBL	CIM	Descrição
Positivo	$CT \geq 0,5$ e $CT/CTL \geq 8$ ou $TZ \geq 1$ e $TZ/TZL \geq 8$ ou Zona fantasma ou deformação da elipse no CT ou TZ	Produção de ESBL e resistência a todos as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (CLSI)
Negativo	$CT \leq 0,5$ ou $CT/CTL < 8$ e $TZ < 1$ ou $TZ/TZL < 8$	Não produtora de ESBL
Não determinada	$CT > 16$ e $CTL > 1$ e Quando uma fita é negativa para ESBL e a outra não determinada	ESBL não determinada. Se a ESBL é suscetível, confirmar o resultado com a genotipagem.

Fonte: Modificado do protocolo AB BIODISK, Suécia.

3.8. Extração do DNA cromossomal e plasmidial

Para o isolamento do DNA das cepas Gram-negativas cada bactéria foi resolada por esgotamento com auxílio de um *swab* em meio sólido Luria-Bertani (LB)

seguido de incubação por 24 horas a 35°C. Entretanto, para a extração do DNA plasmidial o meio LB continha ampicilina a 100µg/mL (Promega, Madison, WI, USA). De cada placa inoculou-se uma colônia em tubos contendo 3mL de meio líquido LB ficando em agitação *overnight* a 35°C. E no caso do plasmídeo o meio líquido continha ampicilina numa concentração de 50µg/mL (Promega, Madison, WI, USA).

As culturas foram transferidas para microtubos tipo *ependorf*[®] de 1,5mL e centrifugados a 12.000rpm a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e em seguida, foram submetidos à extração do DNA cromossomal (onde antes os sedimentos (*pellet*) foram ressuspensos em 200µL de PBS 1X) e à extração plasmidial utilizando-se os protocolos dos *kits Easy DNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e *kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA) (anexos 2 e 3), respectivamente.

As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 0,8% corado com *SYBR safe DNA gel stain* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a partir da eletroforese a 75 Volts (V) por 1 hora comparando-as frente ao padrão molecular 123pb DNA *Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e para a visualização dos plasmídeos foi feita a partir da eletroforese a 75 Volts (V) por 1 hora e 20 minutos em gel de agarose a 0,8%, corado com *SYBR safe DNA gel stain* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), visualizado com transiluminador (*Safe Imager[™] 2.0 Blue-Light Transilluminator*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) comparando-as frente ao padrão de peso molecular *Supercoiled DNA Ladder, 2-10Kb* (Promega, Madison, WI, USA).

3.9. Detecção dos genes *bla* via PCR

A detecção da região no DNA cromossomal e plasmidial contendo os genes *bla* (**beta-lact**amase) foi realizada através da amplificação por PCR utilizando os

iniciadores para os genes relacionados à produção de ESBLs tipo TEM, SHV, CTX-M e OXA: bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} e bla_{OXA} , respectivamente (Lim *et al.*, 2009). O tamanho esperado para os fragmentos amplificados está demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes *bla* e o tamanho esperado do fragmento em pares de base.

Genes	Iniciadores	Seqüências	Tamanho em pb
bla_{TEM}	TEM-F	5' – ATGAGTATTCAACATTTCCG – 3'	867
	TEM-R	5' – CTGACAGTTACCAATGCTTA – 3'	
bla_{SHV}	SHV-F	5' – GGTTATGCGTTATATTCGCC – 3'	867
	SHV-R	5' – TTAGCGTTGCCAGTGCTC – 3'	
bla_{CTX-M}	CTX-F	5' – ATGTGCAGYACCAGTAARGT – 3'	593
	CTX-R	5' – TGGGTRAARTARGTSACCAGA – 3'	
bla_{OXA}	OXA-F	5' – ACACAATACATATCAACTTCGC – 3'	885
	OXA-R	5' – AGTGTGTTTAGAATGGTGATC – 3'	

Legenda: Y = C ou T; R = A ou G; S = G ou C.

Para a amplificação adicionou-se em um tubo *ependorf* de 0,2mL os seguintes reagentes: 5 μ L de tampão 5X; 2,5 μ L de MgCl₂ (25mM); 0,5 μ L de dNTP (10 μ M); 1 μ L de cada iniciador (10 μ M); 0,2 μ L de GoTaq™ *DNA Polymerase* e 5 μ L para DNA cromossomal (5ng) e 1 μ L para DNA plasmidial (1:10). E foi adicionada ao tubo água MiliQ para completar o volume de reação 25 μ L. As amplificações foram realizadas em termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*). As condições de ciclagem da amplificação para os genes bla_{TEM} e bla_{SHV} , bla_{SHV} e bla_{OXA} estão descritas na tabela 5. Dos passos 2 a 4 foram realizados 35 ciclos.

Tabela 5 – Condições de ciclagem da reação de PCR para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA}.

Passos	Evento	Genes			
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}
1	Denaturação inicial	96°C/5 min	96°C/5 min	94°C/7 min	96°C/5 min
2	Denaturação	96°C/1 min	96°C/1 min	94°C/50 seg	96°C/1 min
3	Anelamento	58°C/1 min	60°C/1 min	50°C/40 seg	60°C/1 min
4	Extensão	72°C/1 min	72°C /1 min	72°C /1 min	72°C/2 min
5	Extensão final	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/5 min	72°C/10 min
6	<i>Forever</i>	4°C	4°C	4°C	4°C

O controle negativo de contaminação da reação foi uma reação sem amostra de DNA. Para o controle positivo para a PCR (plasmídeo) do gene *bla*_{TEM} foi utilizada cepa de *Neisseria gonorrhoeae* (Palmer *et al.*, 2010), e para o gene *bla*_{SHV}, cepa de *K. pneumoniae* ATCC® 700603 tanto para o plasmídeo como para o cromossomo.

Para a visualização dos *amplicons*, as amostras foram submetidas à eletroforese a 80 volts (V) por uma hora em gel de agarose a 1,0%, corado com *SYBR safe DNA gel stain* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) comparando frente ao padrão de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos.

3.10. Análise genotípica

Os produtos da PCR para *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} (plasmidial e cromossomal) e *bla*_{SHV} (plasmídeo) foram purificados utilizando-se o *kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, UK) seguindo o protocolo de acordo com as recomendações do fabricante (anexo 4) para retirada dos nucleotídeos não incorporados e excesso de iniciadores. Para os genes *bla*_{CTX-M} (plasmidial) e *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} (cromossomal) o fragmento foi purificado a partir do gel de agarose após eletroforese utilizando-se o mesmo *kit* (anexo 5). O seqüenciamento teve como finalidade identificar o tipo de ESBL produzidas pelos isolados clínicos estudados, as

possíveis mutações e sua associação com o fenótipo de resistência apresentado. A quantificação do DNA plasmidial foi realizada utilizando o marcador *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em gel de agarose. E o DNA cromossomal foi mensurado utilizando o espectrofotômetro de ácido nucléico (ACTGene, Avans, Biotecnology, Taiwan).

As seqüências dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} foram determinadas utilizando-se *Big Dye Terminator Kit v3.1* (*Applied Biosystems*, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Na reação de seqüenciamento foram utilizados os seguintes reagentes para 10µL de volume final de reação: 2µL de tampão (solução “*Save Money*”); 1µL dos iniciadores senso ou antissenso (3,3µM); 1µL de *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystems*, USA); água ultrapura (pra completar o volume de reação) e cerca de 20ng de DNA cromossomal ou plasmidial.

Para o sistema da reação utilizou-se a seguinte ciclagem: 1min a 96°C; seguido de 25 ciclos de 10seg a 96°C, 5seg a 50°C, 4min a 60°C e um ciclo de 4°C por tempo indeterminado. Em seguida, retirou-se a placa para seguir a precipitação do produto da reação de seqüenciamento para a retirada de nucleotídeos não incorporados pela técnica de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de sódio conforme descrito no anexo 6. Antes de aplicar a placa, as amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida Hi-Di, e imediatamente os precipitados foram aquecidos a 95°C por 1min e em seguida foram submetidos à eletroforese no aparelho *ABI 3130 Genetic Sequencer Analyzer* (*Applied Biosystems*) para que fosse feita a eletroforese em gel.

A viabilidade dos fragmentos isolados foi analisada pela qualidade das seqüências obtidos utilizando o programa *Electropherogram quality analysis* do Laboratório de Biologia Molecular da UnB

(<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Para obter os *contigs* das amostras realizou-se um alinhamento utilizando a ferramenta *ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment*, afim de se obter as sequências consenso. E em seguida, as amostras foram comparadas com seqüências homólogas depositadas em banco de dados públicos (NCBI/GenBank/BLAST) para verificar se a identidade das sequências correspondia ao esperado para cada gene estudado.

A identificação das mutações foi realizada utilizando o *site*: <http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>, onde são descritas as posições nas quais ocorreram as mutações para cada tipo de ESBL. Este *site* foi criado no intuito de se estabelecer uma classificação para as β -lactamases de espectro estendido e das seqüências de aminoácidos para TEM, SHV, OXA e CTX de espectro estendido, permitindo assim padronizar uma nomenclatura para os diferentes tipos de ESBL e tornar mais fácil a identificação das substituições de aminoácidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Suscetibilidade antimicrobiana apresentada pelas cepas Gram-negativas produtoras de ESBL

Como se pode observar na tabela 6 todas as cepas produtoras de ESBL estudadas apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol (100%) e ao imipenem (100%), assim como a maioria também não apresentou resistência ao antibiótico amicacina (91,7%). A maioria dos isolados apresentou resistência a ciprofloxacina (91,7%) e a tetraciclina (91,7%), com exceção da cepa 4 (*Serratia* spp.) que teve sensibilidade a ambos antibióticos. A espécie bacteriana que apresentou resistência a um maior número de antibióticos foi a *E. coli* sendo que, para seis isolados de *E. coli* foram obtidos os seguintes resultados: 33,4% resistentes ao cefepime, 16,7% resistentes a ceftazidima e 100% resistentes a tetraciclina. Para dois isolados de *Serratia* spp. foram obtidos os seguintes resultados: 50% resistentes a cefepime, 50% resistentes a ciprofloxacina e 50% resistentes a tetraciclina. Para dois isolados de *B. cepacia* e *Pseudomonas* spp.: 100% foram resistentes a ciprofloxacina e a tetraciclina.

Tabela 6 – Teste de suscetibilidade (Etest®) realizado nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL.

Antibiótico	Bactéria											
	<i>E. coli</i> (n=6)			<i>Serratia spp.</i> (n=2)			<i>B. cepacia</i> (n=2)			<i>Pseudomonas spp.</i> (n=2)		
	S	SR	R	S	SR	R	S	SR	R	S	SR	R
Amicacina	5	1	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Cefepime	1	3	2	1	-	1	1	1	-	1	1	-
Ceftazidima	-	5	1	1	1	-	1	1	-	1	1	-
Cefoxitina	3	1	-	1	1	-	2	-	-	1	1	-
Ciprofloxacina	-	-	6	1	-	1	-	-	2	-	-	2
Cloranfenicol	6	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Imipenem	6	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Tetraciclina	-	-	6	1	-	1	-	-	2	-	-	2

Legenda: S = Sensível; SR = Sensibilidade Reduzida; R = Resistência. (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

A utilização de mais de um antibiótico na detecção de ESBL aumenta significativamente a sensibilidade de identificação de uma cepa produtora de ESBL (Pitout, 2004; CLSI, 2005; Tofteland, 2007). Contudo, a utilização de um maior número de antibióticos se torna mais onerosa e trabalhosa, principalmente nos laboratórios que não utilizam os métodos automatizados. Assim a escolha dos antibióticos baseou-se nos protocolos pelo Ministério da Saúde (MS) e Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

O caráter de resistência em algumas enterobactérias a diferentes antibióticos está associado à presença de genes de resistência a diferentes antibióticos β -lactâmicos e não- β -lactâmicos, como por exemplo, aminoglicosídeos, trimetopim, fluoroquinolonas, sulfamidas, entre outros. Os isolados de *E. coli* utilizados neste estudo apresentaram resistência não só aos β -lactâmicos testados, mas também a antibióticos não β -lactâmicos como tetraciclina (100%), ciprofloxacina (100%), ceftazidima (16,7%) e cefepime (25%). Estes resultados corroboram com estudos realizados em outras regiões geográficas, como em Curitiba (Nogueira *et al.*, 2006),

Cambodia (Ruppé *et al.*, 2009) e Portugal (Gonçalves, 2010), estando presente em isolados produtores de ESBL (Cornaglia *et al.*, 2008).

A resistência a ciprofloxacina foi verificada em quase todas as bactérias produtoras de ESBL, em especial na *E. coli*. Assim como em isolados de *E. coli* (48,5%) em um hospital na Venezuela (Akpaka & Swanston, 2008). Em outros estudos realizados por Sharma e cols. (2010) na Índia e por Hassan e cols. (2011) no Paquistão também foi demonstrado a resistência a ciprofloxacina em *E. coli* de 92% e de 85%, respectivamente. Entretanto, a suscetibilidade ao imipenem (carbapenêmico) e a amicacina (aminoglicosídeo) indica que estes antibióticos ainda podem ser utilizados na terapia das infecções causadas por cepas produtoras de ESBL indicadas nesta pesquisa, uma vez que o imipenem é o antibiótico mais indicado para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias produtoras de ESBL (Shahcheraghi *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2007). Esta suscetibilidade ao imipenem também foi detectada em 91% dos isolados ESBL positivos no estudo de Hassan e cols (2011), no Paquistão.

Além disso, a prevalência de cepas produtoras de ESBL varia entre regiões geográficas e hospitais (Coque *et al.*, 2008; Kiratitshi *et al.*, 2008), sendo que as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* estão amplamente disseminadas, tendo sido reportadas nos EUA, Grécia, Reino Unido, França, Portugal, Holanda, Bolívia, Peru, Brasil, Paquistão, Índia, entre outros (Lago *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2011). E a espécie mais isolada é *K. pneumoniae*, seguida da *E. coli* (Kumar *et al.*, 2006; Romanus *et al.*, 2009).

Entretanto, nos últimos anos, este perfil tem se alterado e nos últimos anos a *E. coli* é a bactéria produtora de ESBL mais freqüentemente isolada (Ruppé *et al.*, 2009). Índices semelhantes foram reportados no Brasil por Lago e cols. (2010) que

detectaram 96 (46,2%) bactérias identificadas como *E. coli* como produtoras de ESBL. Soares e cols. (2005) demonstraram que a prevalência em *E. coli* foi de 1,6% em São Paulo, 1,5% em Porto Alegre e 13,7% no Rio Grande do Sul. Dados de Nogueira e cols. (2006), num estudo realizado em pacientes hospitalizados em Curitiba, mostraram que a prevalência de isolados produtores de ESBL em enterobactérias foi de 24,3%, sendo que em *E. coli*, a prevalência foi de 7,2%.

Estudos em hospitais na Tailândia e no Irã demonstraram que a frequência de *E. coli* produtora de ESBL é de 13,2% (Kiratisin *et al.*, 2008) e 16,8% (Mansouri & Ramazanzadeh, 2009), respectivamente. Neste estudo, das 12 bactérias ESBL positivas, oito pertencem à família *Enterobacteriaceae*, onde seis isolados eram da espécie *E. coli* e dois do gênero *Serratia* spp., correspondendo respectivamente a 50 e 16,6% do total das amostras isoladas; e quatro pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, onde dois isolados eram da espécie *B. cepacia* e do gênero *Pseudomonas* spp, ambas correspondendo a 16,7% das amostras deste estudo, conforme descrito na tabela 7. Os gêneros e as espécies foram confirmados pela técnica de 16S rRNA (Comunicação pessoal: Cristina Motta Ferreira).

Com relação ao teste fenotípico confirmatório, utilizando Etest ESBL[®], pode-se observar que 12/17, apresentaram o fenótipo positivo para ESBL. As Enterobactérias produtoras de ESBL destacam-se entre os patógenos bacterianos por algumas apresentarem multirresistência disseminadas por vários países, como Portugal, Grécia, Suíça, Holanda, Alemanha e Egito (Augusti *et al.*, 2007, Al-Zarouni *et al.*, 2008, Kiratishi *et al.*, 2008) e Brasil (Dropa *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006; Lago *et al.*, 2010) sendo isoladas com muita frequência de amostras clínicas e estão associadas a infecções nosocomiais, e ao alto nível de morbidade e mortalidade (Branger *et al.*, 2005; Shahcheraghi *et al.*, 2009).

Tabela 7 – Bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL identificadas dos pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM.

Bactéria	ESBL positiva	
	n	%
<i>Escherichia coli</i>	6	50
<i>Serratia</i> spp.	2	16,6
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	16,7
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	16,7
Total	12	100

Fonte: Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010.

Apesar das enzimas ESBL serem produzidas principalmente entre membros da família *Enterobacteriaceae*, também podem estar presentes na família *Pseudomonadaceae*. Nos dados obtidos neste trabalho quatro (100%) isolados da família *Pseudomonadaceae* apresentaram fenótipo positivo para ESBL, apresentando maior frequência de isolados, depois da *E. coli* (Picão e Gales, 2007; Shacheraghi *et al.*, 2009).

As *Pseudomonas* spp. produtoras de ESBL que estão distribuídas em todas as regiões geográficas apresentam resistência não só às cefalosporinas de terceira geração, mas também ao imipenem, que é um antibiótico β -lactâmico (Picão e Gales, 2007; Shacheraghi *et al.*, 2009). Todas as bactérias Gram-negativas foram confirmadas pela técnica 16S RNAr.

A presença de ESBL em espécies não enterobactérias (*Pseudomonas* spp. e *B. cepacea*) demonstradas neste estudo demonstram a necessidade de estudos fenotípicos e genotípicos serem realizados em bactérias não enterobactérias nos laboratórios de rotina não só da Fundação HEMOAM, mas também em outros hospitais que fazem uso de cefalosporinas de amplo espectro.

Na figura 9 é apresentado um resultado típico da análise pelo Etest ESBL em algumas cepas de *E. coli*. Em A e B, o fenótipo foi negativo, ou seja, as cepas não eram produtoras de ESBL. Em C e D o fenótipo observado foi positivo para a produção de ESBL e em E, é demonstrada a cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 que foi escolhida pelo CLSI como controle positivo para os testes confirmatórios de detecção de ESBL.

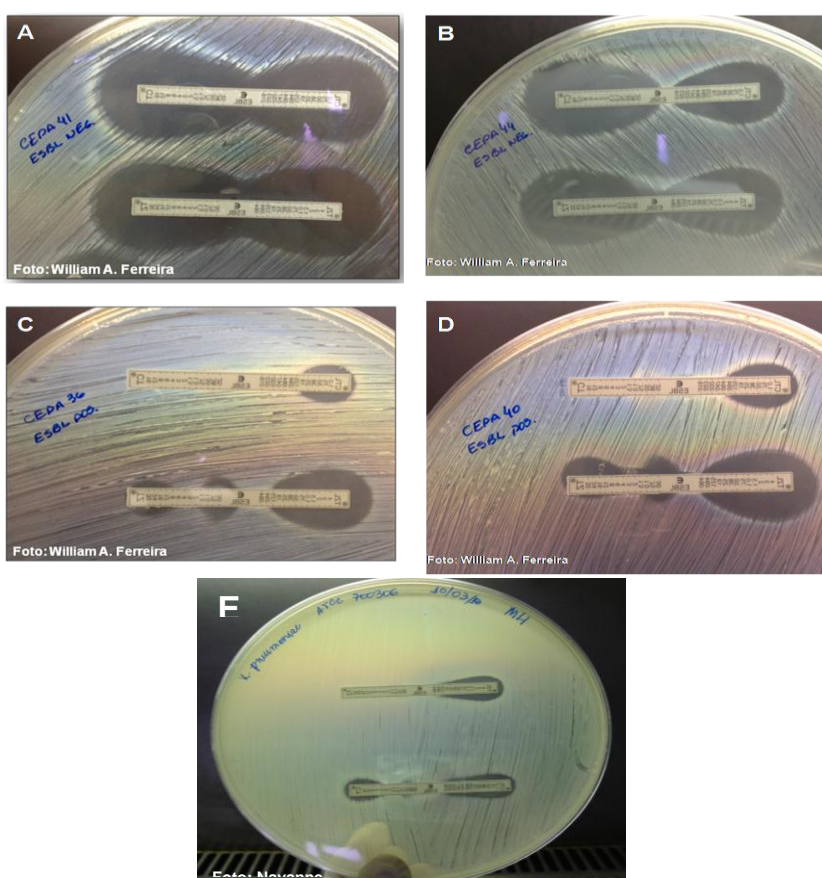


Figura 9 – Detecção de ESBL pelo Etest® ESBL. Antibióticos: CT e CT/CTL (fita superior de cada placa), TZ e TZ/TZL (fita inferior em cada placa). A a D são amostras clínicas de *E. coli*. A e B: ESBL negativa; C e D: ESBL positivo; E: *K. pneumoniae* ATCC700603 (controle positivo).

4.2. Detecção e caracterização dos genes *bla*_{ESBL}

Para as 12 bactérias Gram-negativas ESBL positivas foi obtido o DNA plasmidial (figura 10) e o DNA cromossomal (dados não mostrados). As bandas apresentaram tamanho molecular variando entre 3,5 e 7,0Kb e acima de 10kb (*Serratia* spp. – cepa 18; *E. coli* – cepas 34, 37 e 39). A *Serratia liquefaciens* (cepa 19) apresentou o perfil fenotípico identificado como ESBL indeterminada e não houve o aparecimento de DNA plasmidial.

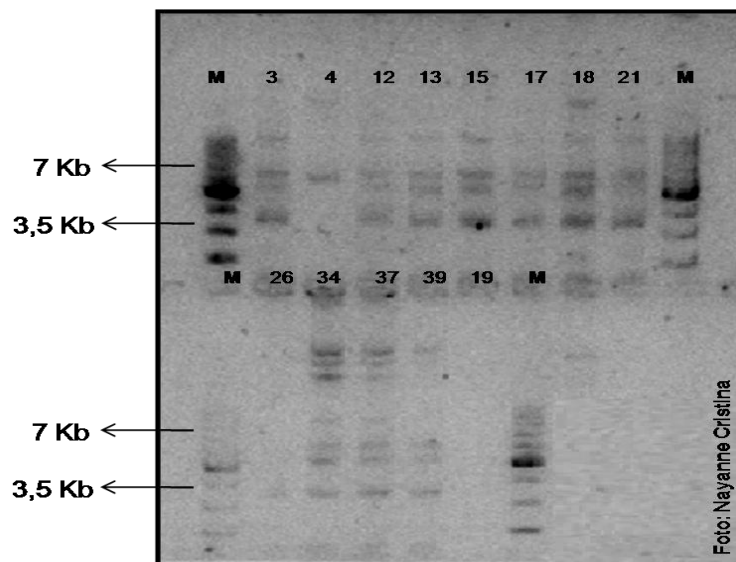


Figura 10 – Detecção de DNA plasmidial em cepas Gram-negativas ESBL positivas. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul. M: *Ladder 2 a 10 Kb* (Promega); 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzeri*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*; 19: *Serratia liquefaciens*.

4.2.1. Detecção dos genes *bla*_{TEM}

Os resultados para a detecção do gene *bla*_{TEM} cromossomal e plasmidial dos 12 isolados produtores de ESBL são mostrados nas figuras 11 e 12. Para o DNA cromossomal, nove cepas apresentaram o fragmento esperado (867pb) correspondente à região codificadora do gene, que foram: *B. cepacia* (12TC); *B. cepacia* (13TC); *E. coli* (15TC); *E. coli* (17TC); *Serratia* spp. (18TC); *P. stutizery* (21TC); *E. coli* (34TC) e *E. coli* (37TC).

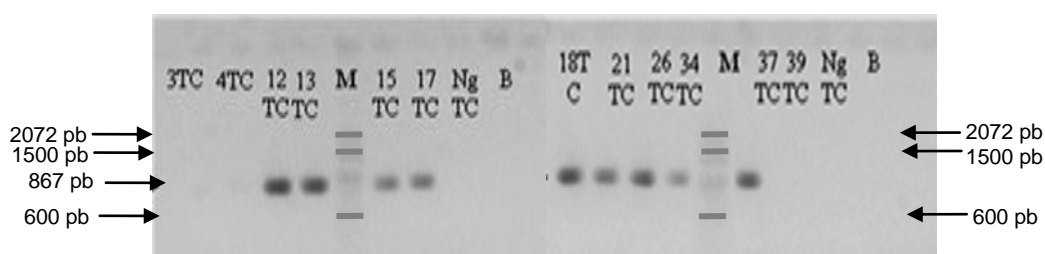


Figura 11 – Detecção do gene *bla*_{TEM} cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul. M: Marcador (100pb DNA Ladder, Invitrogen); B: branco; NgTC: controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutizery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

A partir do DNA plasmidial, 11 cepas apresentaram o fragmento esperado (867pb) correspondente à região codificadora do gene, que foram: *Pseudomonas* spp. (3); *Serratia* spp. (4). *B. cepacia* (12); *B. cepacia* (13); *E. coli* (15); *E. coli* (17); *Serratia* spp. (18); *P. stutizery* (21); *P. stutizery* (26); *E. coli* (34); *E. coli* (37) e *E. coli* (39).

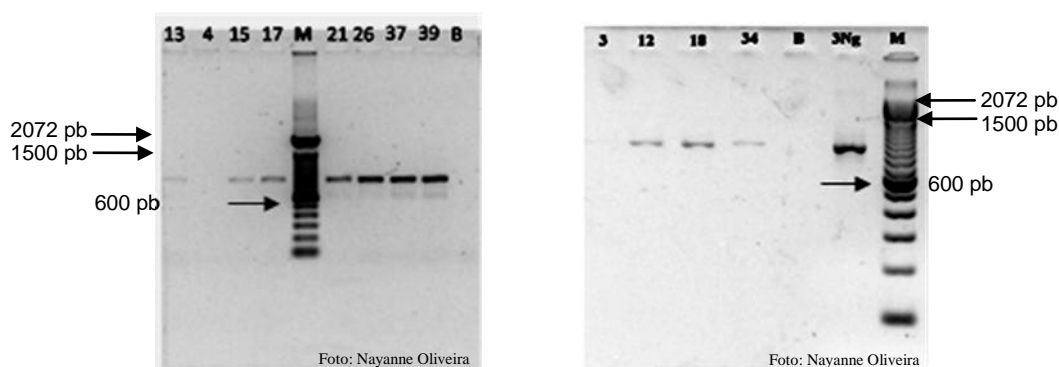


Figura 12 – Detecção do gene bla_{TEM} plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul. M: Marcador (100pb DNA Ladder, Invitrogen); B: branco; Ng: Controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp.; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzeri*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

A cepa 4 (*Serratia* spp.) não apresentou nenhuma banda corresponde ao gene bla_{TEM} , tanto a partir do DNA plasmidial como a partir do cromossomal. Outra cepa que também não apresentou banda (DNA cromossomal) após a PCR foi a 3 (*Pseudomonas* spp.). Para a cepa 4, o DNA plasmidial apresentou apenas uma banda após a extração.

A confirmação do gene bla_{TEM} foi obtida por seqüenciamento nucleotídico e apenas em nas cepas 3 (*Pseudomonas* spp.) e 37 (*E. coli*) foi possível confirmar a presença deste gene (Figura 13). Quando comparadas com as sequências depositadas no banco de dados (NCBI) foi confirmado que gene bla_{TEM} descritos neste trabalho correspondem ao tipo TEM-1. Com isto, pode-se assim, inferir que estas possuem no plasmídeo o gene bla_{TEM-1} , ou seja, provavelmente estas cepas carregam o gene para a β -lactamase clássica, que é comumente mediada por plasmídeos e não é uma ESBL (Patterson *et al.*, 2005). Estes resultados corroboram com os dados apresentados por Lim e cols. (2009) em isolados de *E. coli*.

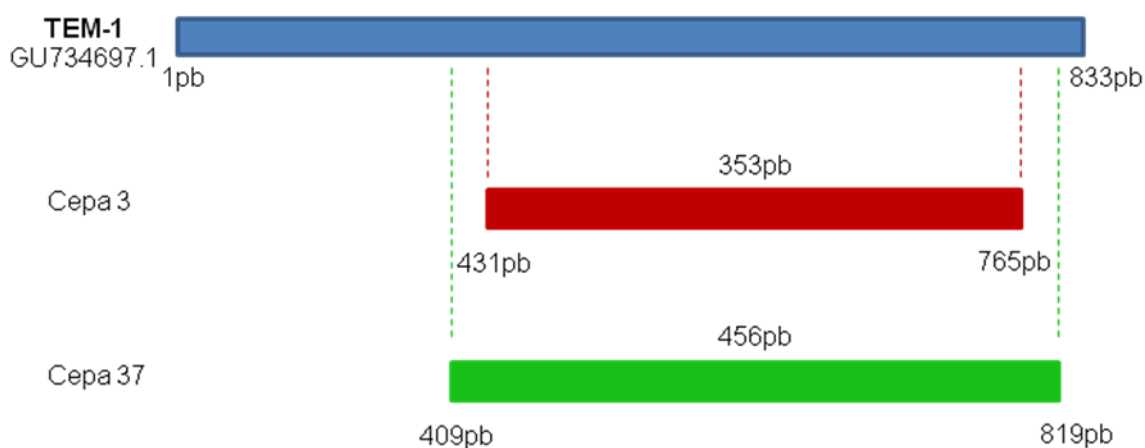


Figura 13 – Esquema representativo do tamanho das sequências para *bla*_{TEM-1} obtidas neste estudo (cepas 3 e 4) e o local na sequência de referência (TEM-1 GU734697.1) onde elas estão possivelmente inseridas.

Provavelmente, o fenótipo positivo para ESBL identificado nestas cepas não estaria associado a este gene. Entretanto ele apresenta importância médica, pois a característica desta enzima TEM-1 é apresentar resistência às penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração, como por exemplo, a cefalotina, ou seja, não possui características para resistência aos antibióticos de amplo espectro (Bradford, 2001; Bush *et al.*, 2009; Bush *et al.*, 2010). Nesta pesquisa não houve a utilização de cefalosporinas de 1ª geração e nem de penicilina por não estarem no protocolo clínico dos antibióticos utilizados na Fundação HEMOAM.

4.2.2. Detecção dos genes *bla*_{SHV}

A detecção do gene *bla*_{SHV} no cromossomo ocorreu em 11 cepas, o que corresponde a 83,4% dos 12 isolados ESBL positivos, que apresentaram o fragmento de 867pb correspondente a região codificadora. Observa-se na figura 14 que somente a cepa 39 (*E. coli*) não possui o gene *bla*_{SHV} na cepa. As amostras nos

géis (a e b) correspondem a: *Pseudomonas* spp. (3); *Serratia* spp. (4). *B. cepacia* (12); *B. cepacia* (13); *E. coli* (15); *E. coli* (17); *Serratia* spp. (18); *P. stutzery* (21); *P. stutzery* (26); *E. coli* (34); *E. coli* (37) e *E. coli* (39).

Algumas cepas apresentaram fragmentos com tamanhos distintos. Apenas as cepas 3, 4, 15 (banda dupla) e 18 (banda dupla) tinham bandas correspondentes à cepa controle. Para todas as amostras somente as bandas correspondentes ao tamanho esperado foram utilizadas para análises posteriores. Com relação as bandas inespecíficas observadas, estudos adicionais, como por exemplo sequenciamento destes fragmentos, devem ser realizados no intuito de confirmar o caráter inespecífico ou se correspondem à variação genética de *bla_{SHV}*.

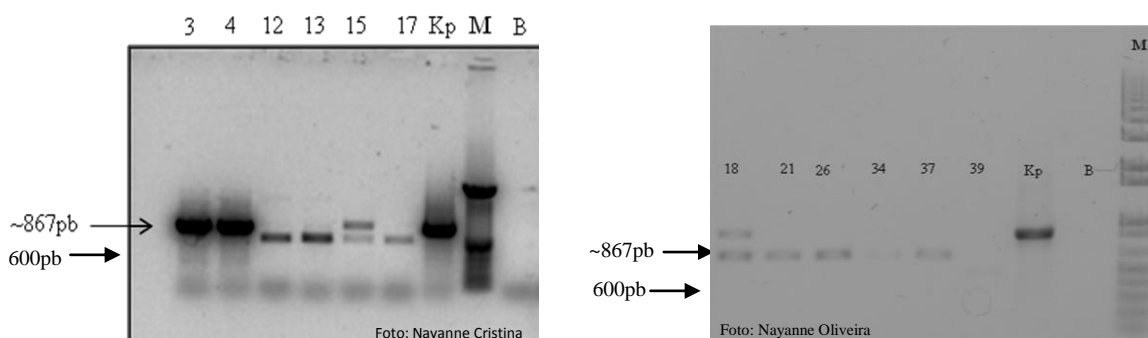


Figura 14 – Detecção do gene *bla_{SHV}* no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul. B: Branco; Kp: Controle positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700603). 3: *Pseudomonas* spp.; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

A partir do DNA plasmidial, o gene *bla_{SHV}* foi identificado em oito dos doze isolados, o que corresponde a 66,6%, com fragmento de 867pb correspondente a região codificadora. Na figura 15 observa-se a amplificação do gene *bla_{SHV}* em *Pseudomonas* spp. (cepa 3), *B. cepacia* (cepas 12 e 13), *E. coli* (cepas 15, 17, 21,

34 e 39). As amostras no gel correspondem a: *Pseudomonas* spp. (3); *Serratia* spp. (4). *B. cepacia* (12); *B. cepacia* (13); *E. coli* (15); *E. coli* (17); *Serratia* spp. (18); *P. stutzery* (21); *P. stutzery* (26); *E. coli* (34); *E. coli* (37) e *E. coli* (39).

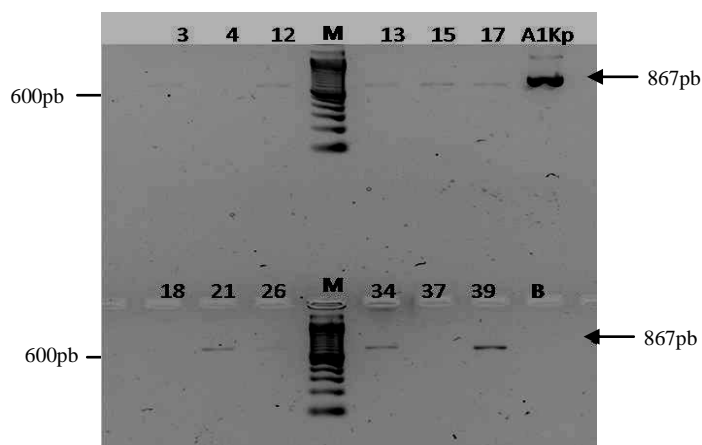


Figura 15 – Detecção do gene *bla_{SHV}* no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul; M: 100pb DNA Ladder Invitrogen; B: Controle negativo; A1Kp: Controle positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700603). 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

As cepas 26 (*P. stutzery*) e 37 (*E. coli*) não apresentaram nenhuma banda correspondente ao gene *bla_{SHV}*, no DNA plasmidial. As cepas 4 e 18 (ambas *Serratia* spp.) apresentaram fragmentos apenas no cromossomo, enquanto que os isolados 12 (*B. cepacia*), 13 (*B. cepacia*), 17 (*E. coli*), 21 (*E. coli*), 34 (*E. coli*) e 39 (*E. coli*) apresentaram fragmentos apenas no plasmídeo. E as cepas 3 (*Pseudomonas* spp.) e 15 (*E. coli*), foram as únicas onde se observou a presença do fragmento correspondente ao gene esperado tanto no DNA cromossomal, como no plasmidial.

A análise da sequência nucleotídica dos fragmentos gênicos indicou similaridade com o gene *bla_{SHV-1}* para as cepas de *Pseudomonas* spp. (cepa 3), de

duas *Serratia* spp. (cepa 4 e 18), *E. coli* (cepa 15) conforme se observa na figura 16. A SHV-1 é uma β -lactamase comumente encontrada no cromossomo e principalmente observada na espécie *K. pneumoniae* (Hammond *et al.*, 2007; Haanpera *et al.*, 2008).

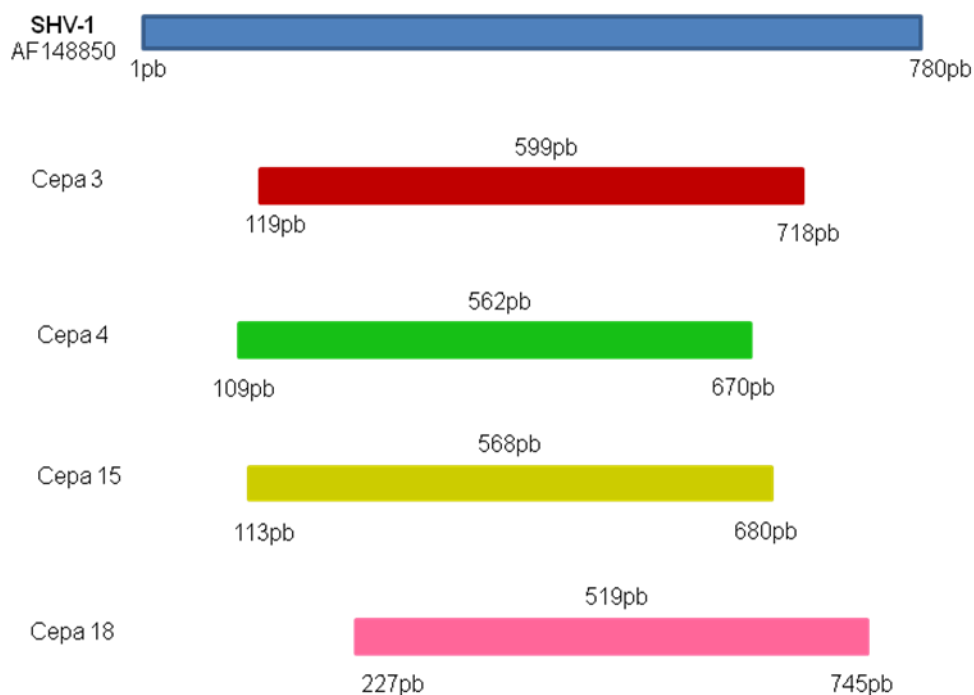


Figura 16 – Esquema representativo do tamanho das sequências para bla_{SHV-1} obtidas neste estudo (cepas 3, 4, 15 e 18) e o local na sequência de referência (SHV-1 AF148850) onde elas estão possivelmente inseridas.

Entretanto, esta enzima também é encontrada em plasmídeos e é considerada uma β -lactamase plasmidial clássica da qual as mutações nesta progenitora (SHV-1) dão origem as ESBL distintas entre as SHV. A pesar de serem freqüentemente codificadas por genes plasmidiais em *E. coli* (Bush *et al.*, 2010), também tem sido encontradas em *E. coli* e em bactérias não enterobactérias como

P. aeruginosa (Jiang *et al.*, 2006) e *Citrobacter* spp. (Jones *et al.*, 2009), para este estudo não houve identificação no DNA plasmidial.

4.2.3. Detecção dos genes *bla*_{CTX-M}

O gene *bla*_{CTX-M} cromossomal foi detectado em 10 dos 12 isolados, o que corresponde a 83,4%, com fragmento de 593pb correspondente a região codificadora. Na figura 17 observa-se que nas cepas 3 (*Pseudomonas* spp) e 4 (*Serratia* spp.) houve amplificação de mais de uma banda e nenhuma delas no tamanho esperado, assim estas não foram utilizadas no seqüenciamento por ser considerada como amplificação inespecífica.

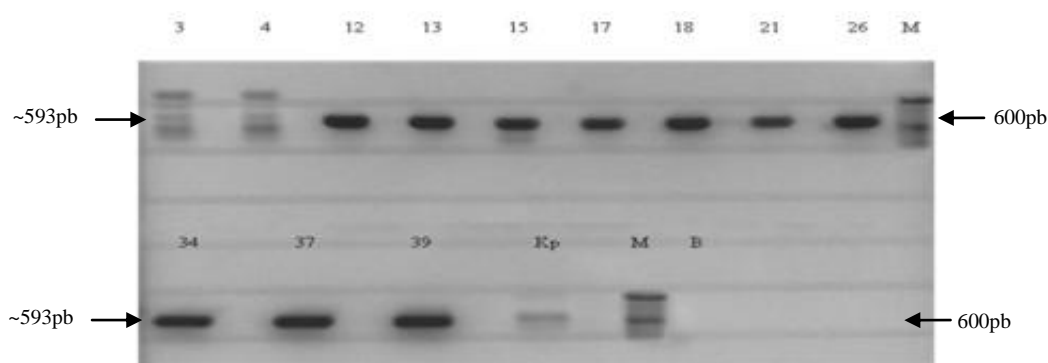


Figura 17 – Detecção do gene *bla*_{CTX-M} no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul; M: 100pb DNA Ladder Invitrogen; B: branco. 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

O gene *bla*_{CTX-M} foi observado após a PCR utilizando o DNA plasmidial nas 12 cepas estudadas com amplificação do fragmento esperado de 545pb indicado pela seta na figura 18. As amostras no gel correspondem a: *Pseudomonas* spp. (3);

Serratia spp. (4); *B. cepacia* (12); *B. cepacia* (13); *E. coli* (15); *E. coli* (17); *Serratia* spp. (18); *P. stutzery* (21); *P. stutzery* (26); *E. coli* (34); *E. coli* (37) e *E. coli* (39).

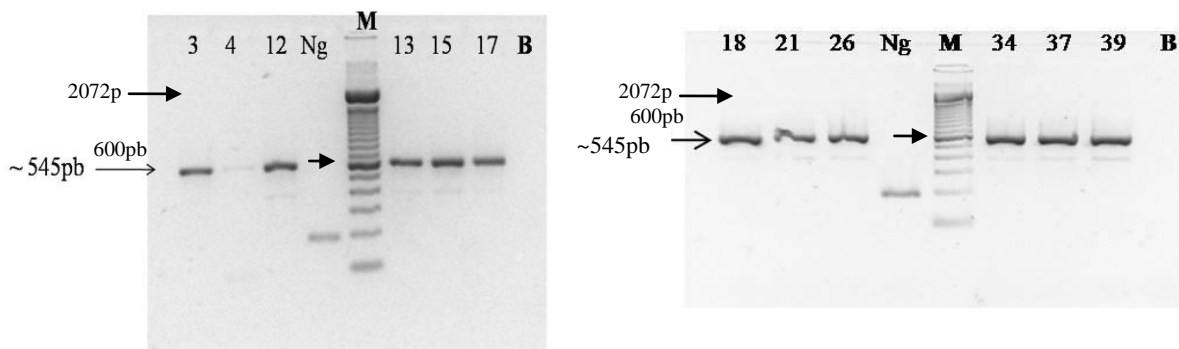


Figura 18 – Detecção do gene *bla*_{CTX-M} no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transluminador de luz azul; M: 100pb DNA *Ladder* Invitrogen; B: branco; Ng: controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp.; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

Muitos estudos têm sido realizados no Brasil para elucidação das enzimas ESBL e estes indicam que a CTX-M é mais freqüente e prevalente no país (Bonnet, 2004). A disseminação rápida e mundial destas enzimas está provavelmente associada ao sucesso do rearranjo genético ocorrido devido às mutações pontuais ocorridas em sua seqüência nucleotídica. Este grupo tem sido detectado na África, América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia (Mendonça *et al.*, 2007). A alta prevalência de bactérias produtoras de ESBL tipo CTX-M em *E. coli* foi detectada neste estudo, conforme descrito na literatura (Tofteland *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2008).

A principal característica das enzimas CTX-M é hidrolizar cefotaxima melhor que ceftizidima, e algumas também são capazes de hidrolisar cefepime segundo Bush *et al.* (2010). Como se pode observar neste estudo, três (21, 34 e 37) isolados

de *E. coli* apresentaram sensibilidade reduzida e dois (17 e 39) apresentaram resistência ao cefepime. Assim como uma cepa de *Pseudomonas* spp. (3) e uma (12) de *B. cepacia* que demonstraram também sensibilidade reduzida, e uma *Serratia* spp. (4) apresentou sensibilidade ao cefepime.

Na detecção molecular dos genes para CTX-M, observou-se que todos os isolados apresentaram este gene tanto no cromossomo quanto no plasmídeo. Entretanto, na *Pseudomonas* spp. (cepa 3) observou-se a presença apenas no plasmídeo e na *Serratia* spp (cepa 4) não foi detectado gene plasmidial ou cromossomal. Todos os genes amplificados pela PCR foram seqüenciados e devido à similaridade da seqüência com a comparada no banco de dados, pode-se inferir que estas pertencem ao subgrupo CTX-M-15 (figura 19).



Figura 19 – Esquema representativo do tamanho das seqüências para *bla*_{CTX-M-15} obtidas neste estudo (cepas 3, 12, 13, 15, 17, 18, 21, 26, 34, 37 e 39) e o local na seqüência de referência (CTX-M-15 HQ175999) onde elas estão possivelmente inseridas.

Este resultado é semelhante ao da literatura que mostra que dentre as enzimas que compõe a família CTX-M, a CTX-M-15 é a mais comumente isolada no mundo (Shakil & Khan, 2010) e vem substituindo a prevalência de variantes de TEM e SHV (Livermore, 2009). Dados de Coque *et al.* (2008) demonstram que em sete anos (2000-2007) os plasmídeos envolvidos na disseminação da ESBL CTX-M-15 de origem hospitalar, na Europa, foram encontrados em países como Espanha, Portugal, Itália, Turquia, Suíça, França, Canadá, Índia, Noruega e Kuwait nas espécies de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

4.2.4. Detecção dos genes *bla_{OXA}*

O gene *bla_{OXA}* cromossomal foi detectado em 10 (83,4%) dos 12 isolados, com fragmento de 885pb. Na figura 20 observa-se que nas cepas 3 (*Pseudomonas* spp) e 4 (*Serratia* spp.) não houve amplificação do fragmento gênico.

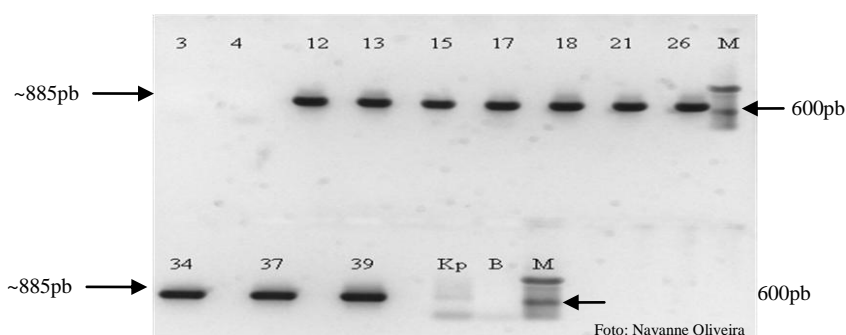


Figura 20 – Detecção do gene *bla_{OXA}* no DNA cromossomal de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul; M: 100pb DNA Ladder Invitrogen; B: Branco; Kp: controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzeri*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

O gene *bla*_{OXA}, após a PCR a partir DNA plasmidial foi detectado em 11 dos 12 isolados com DNA plasmidial, com fragmento de 885pb correspondente a região codificadora. Na figura 21 observa-se que apenas na cepa 4 (*Serratia* spp.) não houve amplificação do fragmento esperado do gene.

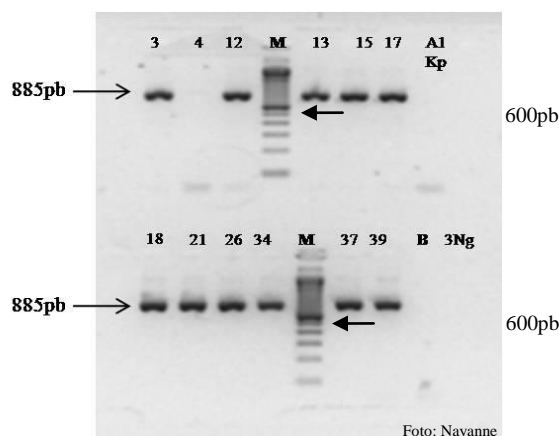


Figura 21 – Detecção do gene *bla*_{OXA} no DNA plasmidial de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul; M: 100pb DNA Ladder Invitrogen; B: Branco; A1Kp e 3Ng: controle negativo. 3: *Pseudomonas* spp; 4: *Serratia* spp.; 12: *B. cepacia*; 13: *B. cepacia*; 15: *E. coli*; 17: *E. coli*; 18: *Serratia* spp.; 21: *E. coli*; 26: *P. stutzery*; 34: *E. coli*; 37: *E. coli*; 39: *E. coli*.

Para o gene *bla*_{OXA}, o subgrupo encontrado foi OXA-1 em todos os isolados nos quais foi detectada a presença do gene (figura 22). O tipo OXA-1 é uma das enzimas mais comumente encontradas na família *Enterobacteriaceae* (Boyd & Mulvey, 2006; Mendonça *et al.* 2006). Estudo realizado por Shacheraghi e cols (2009) em um hospital no Irã, indicou que o subgrupo *bla*_{OXA-1} estava presente em 28 (24,4%) isolados produtores de ESBL e as demais ESBL tipo OXA tem sido encontradas principalmente em *P. aeruginosa*. O tipo OXA-1 é capaz de hidrolisar cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (Paterson *et al.*, 2005).



Figura 22 – Esquema representativo do tamanho das sequências para *bla*_{OXA-1} obtidas neste estudo (cepas 12, 13, 15, 17, 18, 21, 26, 34, 37 e 39) e o local na sequência de referência (OXA-1 J02967) onde elas estão possivelmente inseridas.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, a maioria das bactérias apresentou sensibilidade reduzida a ceftazidima e apenas uma (*E. coli*) apresentou resistência a este antibiótico. Com estes dados não se pode afirmar que a resistência a ceftazidima esteja relacionada à OXA-1, pois o tipo CTX-M também confere resistência a este antimicrobiano. Possivelmente, a coexistência de CTX-M-15 e OXA-1 podem ter possibilitado a identificação destas cepas como produtoras de ESBL.

4.2.5. Caracterização dos genes *bla*

Cepas produtoras de ESBL foram testadas para a presença de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} e *bla*_{SHV}, pois a maioria das ESBL pertencem às famílias TEM e

SHV, entretanto, as famílias OXA e principalmente CTX-M tem crescido de forma significativa nos últimos anos (Livermore, 2009). Na tabela 8 pode-se verificar que todos os isolados bacterianos produtores de ESBL apresentaram os quatro genes estudados associado à codificação da enzima β -lactamase (*bla*), exceto a cepa 4 (*Serratia* spp.), que apresentou apenas dois genes (TEM e SHV) e cepa 37 (*E. coli*) que não apresentou o gene para SHV.

Das 12 bactérias submetidas à PCR utilizando DNA cromossomal para a identificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, em nove foi amplificado um fragmento de 867pb, em quatro um fragmento de 867pb, em 10 um de 593pb e em 10 um fragmento de 885pb, respectivamente. E para o DNA plasmidial, 12 apresentaram fragmentos correspondentes para *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, 8 para *bla*_{SHV} e 11 para *bla*_{OXA}.

Tabela 8 – Identificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} no DNA cromossomal e plasmidial das bactérias Gram-negativas.

Amostra n.	Bactérias	Genes amplificados (<i>bla</i>)							
		TEM		SHV		CTX		OXA	
		C	P	C	P	C	P	C	P
3	<i>Pseudomonas</i> spp.		X	X	X		X		X
4	<i>Serratia</i> spp.			X			X		
12	<i>B. cepacia</i>	X	X		X	X	X	X	X
13	<i>B. cepaia</i>	X	X		X	X	X	X	X
15	<i>E. coli</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
17	<i>E. coli</i>	X	X		X	X	X	X	X
18	<i>Serratia</i> spp.	X	X	X		X	X	X	X
21	<i>E. coli</i>	X	X		X	X	X	X	X
26	<i>P. stutzery</i>	X	X			X	X	X	X
34	<i>E. coli</i>	X	X		X	X	X	X	X
37	<i>E. coli</i>	X	X			X	X	X	X
39	<i>E. coli</i>		X		X	X	X	X	X
Total		9	12	4	8	10	12	10	11

Legenda: C = cromossomo; P = plasmídeo; X = detecção do gene.

Na tabela 9 observa-se resumidamente o genótipo dos 12 isolados ESBL positivos, onde apenas uma cepa (*Serratia* spp.) carregava dois tipos de genes, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*. As cepas 37 (*E. coli*) e 3 (*Pseudomonas* spp.) carregava genes para *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* e *bla_{OXA}* e os demais isolados (9) apresentaram todos os genes estudados (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX}*, *bla_{OXA}* e *bla_{SHV}*).

Tabela 9 – Identificação dos genes codificadores de ESBL nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL pela PCR.

Genótipo	Bactéria	No. de isolados
<i>bla_{SHV}</i> + <i>bla_{CTX-M}</i>	<i>Serratia</i> spp.	1
<i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{OXA}</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	1
	<i>E. coli</i>	1
	<i>Serratia</i> spp.	1
<i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{SHV}</i> + <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{OXA}</i>	<i>B. cepacia</i>	2
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1
	<i>E. coli</i>	5
	Total	12

A presença na mesma bactéria de mais de um gene em plasmídeos possibilita o aumento de seu espectro de ação aos antibióticos e conseqüentemente sua possibilidade de disseminação (Dropa, 2006). Estes dados demonstram a presença de três das ESBLs mais comuns: TEM (100%), SHV (66,7%) e CTX-M (100%) nas bactérias estudadas, assim como nos resultados observados por Ryoo e cols. na Coréia (2005) e por Oliveira e cols. (2009), no Rio Grande do Sul, que identificaram a presença dos três genes TEM (63,6%), SHV (40,9%) e CTX (4,5%) em cepas de *E. coli* isoladas de ambiente hospitalar.

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) representam, sem dúvida, o principal mecanismo de resistência em *Enterobactérias*, sendo os plasmídeos

apontados como os principais responsáveis pela disseminação deste tipo de resistência, bem como a aquisição de resistência a diversos antibióticos e de disseminação entre diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. Além disso, a ocorrência de bactérias não-enterobactérias produtoras de ESBL também tem aumentado, sendo necessário avaliar na rotina laboratorial a presença destas. Nos últimos anos as cepas produtoras de ESBL têm aumentado e se tornaram um grande problema de saúde pública mundial (Chaudhary & Aggarwal, 2004; Ruppé *et al.*, 2009; Dallenne *et al.*, 2010).

A combinação de OXA-1 e TEM-1 com CTX-M-15 já tem sido reportada no Reino Unido (Livermore & Hawkey, 2005), Canadá, Índia (Boyd *et al.*, 2004), Portugal (Mendonça *et al.*, 2006) e na Bélgica, onde TEM-1 foi encontrada em 82% e OXA-1 em 57% associadas a CTX-M-15 (Rodriguez-Villalobos *et al.*, 2010). No estudo apresentado neste trabalho apenas a cepa 37 (*E. coli*) apresentou esta característica de associação dos três genes.

As demais apresentaram CTX-M-15 associada à OXA-1. A bactéria *Serratia* spp. (cepa 4) apresentou apenas o gene pra família SHV-1. Na tabela 10, observa-se o resultado do seqüenciamento identificando a similaridade das sequências (anexo 7) com as sequências depositadas no banco de dados.

Tabela 10 – Identificação dos genes codificadores de ESBL nas 12 bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL após o sequenciamento.

Genótipo	Bactéria	No. da cepa	No. de isolados
<i>bla</i> _{SHV-1}	<i>Serratia</i> spp.	4	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>E. coli</i>	37	1
<i>bla</i> _{SHV-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>E. coli</i>	15	1
	<i>Serratia</i> spp.	18	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>Pseudomonas</i> spp.	3	1
	<i>B. cepacia</i>	12 e 13	2
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>E. coli</i>	17, 21, 34 e 39	4
	<i>P. stutzeri</i>	26	1
	Total		12

Segundo Bonnet (2004), os genes que codificam as enzimas CTX-M, em isolados clínicos, tem sido isolados de plasmídeos que apresentam variados tamanhos (7Kb a 160Kb), podendo também coexistir com estes plasmídeos os genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{OXA-1} ou *bla*_{OXA-30}. Esta combinação de genes também foi observada na Coréia, Senegal e Espanha.

Nesta pesquisa todas as cepas que possuíram genes para CTX-M também apresentaram para OXA-1, entretanto apenas na cepa 37 (*E. coli*) foi detectada existência do gene *bla*_{TEM-1}, coexistindo com *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA-1} conforme descrito pelo autor. Além disso, estes plasmídeos podem também conter genes associados à múltipla resistência, ou seja, não só a antibióticos β-lactâmicos, mas também a aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfamidas, trimetropim e tetraciclina.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A presença de multigenes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}) e a resistência a antibióticos não-β-lactâmicos detectados nas enterobactérias e não-enterobactérias isoladas de amostras clínicas nesta pesquisa se torna relevante pois, oferece informações a cerca da presença de resistência a estes antibióticos em nossa região.
- A identificação de ESBL em espécies não-enterobactérias mostra a importância de se pesquisar a presença destas enzimas na rotina laboratorial e molecularmente.
- A presença de genes associados à produção de ESBL plasmidiais em cromossomos implica na possível transferência destes em elementos móveis como transposons, porém estudos mais precisos necessitam ser realizados para se saber o que realmente está possibilitando a ocorrência destes genes em ambos os tipos de DNA.
- A detecção de genes associados à produção de ESBL foi detectada tanto no DNA cromossomal quanto no plasmidial.
- A continuidade desta pesquisa envolvendo maior número de isolados clínicos, testes de suscetibilidade utilizando outros antibióticos e a caracterização destes genes em bactérias Gram-negativas, não só da Fundação HEMOAM, mas em outros hospitais é necessária para melhor se compreender os mecanismos evolutivos e de disseminação das bactérias produtoras de ESBL na nossa região.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpaka PE, Swanston W. Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a Tertiary hospital in Trinidad & Tobago. 2008; 12 (6):516-520.

Al-Jasser AM. Extended-Spectrum beta-lactamses (ESBLs): A global problem. Kuwait Medical Journal. 2006; 38(3): 171-185.

Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the United Arab Emirates. Medical principles and practice. 2008; 17: 32-36.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto Hospitais sentinela. Brasil; c2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/sentinela/>. Acesso em 10 de janeiro 2010.

Augusti GR, Superti S, Zavascki AP. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Scientia Medica. Porto Alegre. 2007; 17(4): 192-196.

Baaren PV, Belkum AV, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BPHJ. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenetic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiol Rev. 2007; 31: 239-277.

Banderó Filho VC, Reschke CR, Horner R. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na Unidade de terapia intensiva infantil do hospital de Caridade e bebeficiência da Cachoeira do Sul, RS, Brasil. Revista de Bacteriologia. 2006; 38(4):267-270.

Bauernfeind A, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, Wilhelm R, Casellas JM, Goldberg M. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. Infection. 1992; 20: 158-163.

Bertrand S, Weill FX, Cloeckert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, Dierick K, Wildemaue C, Godard C, Butaye P, Imberechts H, Grimont PAD, Collard JM. Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). Journal of Clinical Microbiology. 2006; 44(8): 2897-2903.

Bhattacharjee A, Sen MR, Anupurba S, Prakash P, Nath G. Detection of OXA-2 group extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; doi: 10.1093/jac/dkm267.

Bhattacharya S. ESBL – from petri dish to the patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006; 24(1): 20-24.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(1):1-14.

Boyd DA, Mulvey MR. OXA-1 is OXA-10 is OXA-1. *Journal of Antimicrob Chemotherapy*. 2006; 58: 224-225.

Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program – Healthcare Canada. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(10): 3758-3764.

Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 1980-1984.

Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14: 933-951.

Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, Gouriou S, Picard B, Denamurt E. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum β -lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11(1): 54-61.

Bush K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology reviews*. 1988; 1(1): 109-123.

Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989; 33(3): 259-263.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with the molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1211-33.

Bush K, Jacoby GA. An updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother. Mini Review*. 2009; doi:10.1128/AAC.01009-09: a11-28.

Bush K, Jacoby GA. Update functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 2010; 54(3): 969-976.

Bush K, Macalintal C; Rasmussen BA; Lee VJ, Yang, Y. Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. *Microbial agents and chemotherapy*. 1993; 37(4): 851-858.

Cantón R, Coque T. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinon in Microbiology*. 2006; 9(5): 466-475.

Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Review. *Clinical Microbiology Infection*. 2008; 14 (Suppl. 1):114-153.

Carneiro LC, Carvalhares TT, Pesquero MA, Quintana RC, Feitosa SB, Filho JE, Oliveira MAC. Identificação de bactérias causadoras de infecção hospitalar e avaliação da tolerância a antibióticos. 2008; NewsLab, Edição 86.

Centers for Disease Control and Prevention. 1998. National nosocomial infections surveillance system antimicrobial resistance surveillance report [on line] http://www.cdc.gov/ncidod/hip/NNIS/AR_Surv1198.htm. Acessado em 10 de janeiro de 2010.

Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microbiol*. 2004; 22: 75-80.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performace standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th Informational supplement, M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 177pp.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performace standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th Informational supplement, M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 160pp.

Coque TM, Baquero F, Caton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Review articles. *Eurosurveillance*. 2008; 13(47): 1-11.

Cornaglia G, Garau J, Livermore DM. Living with ESBL. Introduction. *Clinical Microbial and Infection*. 2008; 14 Suppl 1:1-2.

Courvalin P. Antibiotic resistance: the pos and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*. 2006; 38(2): S261-265.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assay for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 65: 490-495.

Dalmarco EM; Blatt SL, Córdova CMM. Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro-estendido (ESBLs) – Revisão. *Revista de Bacteriologia*. 2006; 38(3): 171-177.

Dashti AA, West P, Paton R, Amyes SGB. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Kuwait and UK strains identified by the Vitek system, and subsequent comparison of the Vitek system with other commercial

ESBL-testing systems using these strains. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55: 417-421.

Dropa M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital de rede pública da cidade de São Paulo, 2006; 116f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassetari VC, Franco F, Guida SM, Balabakis AJ, Passadore LF, Santos SR, Matté GR, Matté MH. Extended-spectrum beta-lactamase among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009; 4(51): 203-209.

Du B, Long Y, Liu H, Chen D; Liu, D; Xu, Y; Xie, X. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med*. 2002; 28: 1718-1723.

Egervan M. Antibiotic resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus platarum*. Doctoral Thesis. 68f. 2009; Swedish University of agricultural sciences – Uppsala.

Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 707-712.

Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, Parvin M, Yadegarinia D. Distribution of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad hospital, Tehran, Iran. *Microbiology drug resistance*. 2009; 00(00): 1-6.

Ferreira CM, Ferreira WA, Almeida, NCOS, Naveca FG, Barbosa MG. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, accept.

Ferreira CM, Naveca FG, Ferreira WA, Almeida, NCOS, Oliveira CMC de, Barbosa MG. Staphylococcal cassette chromosome isolated from patients with hematological diseases under treatment at the Hematology Center of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, accept.

Ferreira LL. Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*. 2005; 114f. Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

Freitas AL, Machado DP, Soares F da SC, Barth AL. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp. And *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2003; 4(34): 344-348.

Freitas, VR, Picoli SU. A coloração de Gram e as variações na sua execução. NewsLab. 2007; Edição 82: 125-128.

Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. Cellular Microbiology. 2006; 8 (11): 1707-1719.

Gonçalves TMP. Caracterização de genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar. 2010; 89f. Monografia, Universidade Fernando Pessoa – Porto.

Gupta V. An update on newer β -lactamases, Indian J. Med. Res. 2007; 126: 417-427.

Haanpera M, Forssten SD, Huovinen P, Jalava J. Typing of SHV Extended-spectrum β -lactamases by pyrosequencing in *Klebsiella pneumoniae* strains with chromosomal SHV β -lactamase. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008; 5(7): 2632-2635.

Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(8):1637-1644.

Hammond DS, Harris T, Bell J, Turnidge J, Giffard PM. Selection of SHV extended-spectrum- β -lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-born *bla*_{SHV} gene. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008; 52(2): 441-445.

Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. Microbiologia Médica. 2ª edição Editora Artmed®. 2008.

Hassan SA, Jamal SA, Kamal M. Occurrence of multidrugs resistance and ESBL producing *E. coli* causing urinary tract infections. Journal of Basic and applied Sciences. 2011; 7(1): 39-43.

Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006; 50(9): 2990-2995.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009; 53(2): 465-475.

Khorvash F, Mostafavizadeh K, Mostafavizadeh S, Behjati M, Salehi M. Emergence of cefepime resistance in Gram-negative induced nosocomial infections. Iranian Journal of clinical infectious diseases. 2009; 4(1): 13-18.

Kingsley J, Verghese S. Sequence analysis of *bla*_{CTX-M-28}, an ESBL responsible for third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae*, for

the first time in India. *India Journal of Pathology and Microbiology*. 2008; 51(2): 218-221.

Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates causing health care-associated in Thailand, Where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(8): 2818-2824.

Kumar MS, Lakshmi V, Rajapopajan R. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae spp. Isolated at a tertiary care institute. *Indian J Med Microbiol*. 2006; 24(3): 208-211.

Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010; 43(3):430-434.

Lal P, Kapil A, DAS BK, Sood, S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res*. 2007; 125: 173-178.

Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgenses JH. First report of the emergence of CTX-M type ESBL isolated in a U.S. healthcare system. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2007; 51(11): 4015-4021.

Lim KT, Yasin R, Yeo CC, Puthucheary S, Thong KL. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009; Volume 2009, Article ID 165637: 1-10.

Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1995; 8(4): 557–584.

Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBL in the UK. *J. Antimicrob Chemother*. 2005; 56:451-454.

Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Enterobacteriaceae* from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 62(2): ii41-ii54.

Livermore DM. Why have CTX-M ESBLs spread more than TEM and SHV mutants? *Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory*. 2009; 34-36.

Luz MMAVRMR. Isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, da comunidade, produtores de β -lactamase de espectro alargado. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Análises clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

Mansouri M, Ramazanzadeh R. Spread of Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* clinical isolates in Sanandaj hospitals. *Journal of Biological Sciences*. 2009; 9(4): 363-366.

Mendonça N, Leitão, J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51 (6):1946-1955.

Mendonça N, Louro D, Castro AP, Diogo J, Caniça M. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 57: 1014-1016.

Ministério da Saúde do Brasil. Portaria no. 2.616, de 12/05/1998. Diário Oficial, Brasília. 1998.

Ministério da Saúde. Técnica de coloração de Gram. Programa nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Série TELELAB. Brasília, 2001.

Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, Paton S, The Canadian Hospital Epidemiology Committee of the Canadian nosocomial infections surveillance program Health Canada. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In Canadian hospitals. *Microbial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(4): 1204-1214.

Mulvey MR & Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Canadian Medical Association Journal*. 2009; 180(4): 408-415.

Nogueira KS, Higuti IH, Nascimento AJ, Terasawa LB, Oliveira S, Matos AP, Souza HAPHM, Cogo LL, Costa LMD. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2006; 10(6): 390-395.

Oliveira CF, Forno NLD, Alves IA, Horta JA, RI, Rieger A, Alves SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-m de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no hospital of Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009; 42(5): 556-560.

Oliveira KRP. β -lactamase na família *Enterobacteriaceae*: Métodos de detecção e prevenção, 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and others aerobic Gram-negative bacilli. 2005, *Clinical Microbiology Reviews*. 18:147-162.

Padrão MC, Monteiro ML, Maciel NR, Viana FFCF, Freitas NA. Prevalência de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva. *Ver Bras Clin Med*. 2010; 8(2):125-128.

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3554-3560.

Paterson, DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18(4): 657-686.

Palmer HM, Leeming JP, Turner A. A multiplex polymerase chain reaction to differentiate β -lactamase plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 45: 777-782.

Pereira MAP, Palomo FS. Análise so sistema automatizado para coloração de Gram desenvolvido pela Hemogram. *NewsLab*. 2010; Edição 102: 128-135.

Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBL. *Curr Opin Pharmacol*. NIH Public Access. 2007; 7(5): 459-469.

Picão RC, Gales AC. 2007. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? . *Prática Hospitalar* 49: 79-84.

Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(12):5715-5721.

Rodriguez-Villalobos H, Berhin C, Bauraing C, Deplano A, Montesinos I, Mendonça R de, Jans B, Glupczynski Y. Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; doi: 10.1093. pages 1-11.

Romanus II, Egwu OA, Ngozi AT, Chodiebube NA, Chika EP. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) mediated resistance to antibiotics among *Klebsiella pneumoniae* in Enugu metropolis. *Medical Journal of Medical sciences*. 2009; 2(3): 1-4.

Rossi F, Andreazzi DB. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Editora Atheneu, São Paulo. 2005.

Ruppé E, Hem S, Lath S, Gautier V, Ariey F, Sarthou J-L, Monchy D, Arlet G. CTX-M β -lactamases in *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. *Emerging Infections Diseases*. 2009; 15(5): 741-748.

Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YL, Lee K, Bae IK, Song EH, Jeong SH. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56: 698-702.

Sabra AH, Araj GF, Kattar MM, Abi-Rachad RY, Khairallah M-T, Klena JD, Matar GM. Molecular characterization of ESBL-producing *Shigella sonnei* isolates from patients with bacillary dysentery in Lebanon. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3(4): 300-305.

Sanders CC, Sanders WE Jr. Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Diseases*. 1992; 15(5): 824-839.

Santos LF, Veira Jr VM, Santos AF, Alvarez CCS, Pereira CAS, Lopes FA, Carvalho NCP, Oliveira OA. Fontes potenciais de agentes causadores de infecção hospitalar: esparadrapos, fitas adesivas e luvas de procedimento. *Rev Panam Infectol*. 2010; 12(3): 8-12.

Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(5): 2137-2139.

Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hamed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum- β -lactamases. *Res Microbiol*. 2004; 155: 409-421.

Shahcheraghi F, Nasiri S, Noiveri. Detections of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Clinical Infections Diseases*. 2009; 4(2):65-70.

Shakil S, Khan AU. Interaction of CTX-M-15 enzyme with cefotaxime: a molecular modeling and docking study. *Bioinformation*. 2010; 4(10): 468-472.

Sharma J, Ray P, Sharma M. Plasmid profile of ESBL producing Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β -lactam drugs. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2010; 53(1): 83-86.

Silva EAMS. Detecção de Beta-lactamase de espectro estendido em isolados clínicos bacterianos. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco - Recife.

Sítio: www.lahey.org/Studies/. Acessado em 2011.

Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*. 2008; 12 (4): 1-7.

Soares G, Moura JU, Saucedo EM, Pereira RS, Santos RCV. Prevalência de beta-lactamases de espectro estendido ampliado (ESBL) em Enterobactérias isolados do trato urinário de pacientes ambulatoriais de Santa Maria – RS. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da saúde, Santa Maria*. 2005; 6(1): 45-52.

Souza Jr. MA, Ferreira ES, Conceição GC. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL): Um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. NewsLab. 2004; Edição 63.

Superti SV, Augusti G, Zavascki AP. Risk factors and mortality of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2009; 51(4): 211-216.

Tasli H, Bahar H. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. Jpn. J. Infect. Dis. 2005; 58: 162-167.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine. 2006; 119 (6A): S3-S10.

Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, Sundsfjord A, Norwegian ESBL Study Group. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum β -lactamases-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45: 199-205.

Tolentino FM. Detecção e identificação dos genes de beta-lactamases *blaSHV*, *blaTEM* e *blaCTX-M* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um hospital terciário do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. São José do rio Preto. 2009.

Tosin I, Silbert S, Sader HS. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian hospitals. Braz J Infects Dis. 2003; 7: 360-369.

Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Review. Postgrad Med J. 2002; 78: 216-224.

Winn Jr. WC, Allen SD, Janda WM, Koneman et al., 2008 EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. **Diagnóstico microbiológico** – Texto e Atlas colorido. 6a. edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1565pp. 2008.

ANEXO 1 – Folha de aprovação emitida pelo Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0306.0.115.000-09, intitulado: “Caracterização molecular das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) de bactérias gram-negativas isoladas de amostras clínicas de pacientes atendidos na Fundação HEMOAM”, tendo como Pesquisadora Responsável Nyanne Cristina Oliveira da Silva Almeida .

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 02 de dezembro 2009.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. J. Monteiro', is positioned above the printed name of the coordinator.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador do CEP/UFAM

ANEXO 2 – Protocolo de extração de DNA total bacteriano pelo kit Easy DNA™ (Invitrogen)

Isolamento do DNA

1. Adicionar 350µL de solução A (solução de lise) na suspensão celular e homogeneizar por inversão cuidadosamente.
2. Incubar a 65°C em banho-maria por 20 min.
3. Adicionar 150µL de solução B (solução de precipitação) e homogeneizar por inversão até que amostra esteja uniformemente viscosa (10 seg a 1 min).
4. Adicionar 500µL de clorofórmio PA, vortexar até diminuir a viscosidade e a mistura ficar homogênea.
5. Centrifugar em velocidade máxima (14.000rpm) por 15 min a 4°C para separar as fases. Retirar com auxílio de uma pipeta o sobrenadante e transferir para um novo tubo *ependorf*.

Precipitação do DNA

6. Adicionar 1 mL de etanol 100% gelado gelado e homogeneizar por inversão.
7. Incubar por 1 hora e 30 min em gelo.
8. Centifugar a 14.000 rpm por 12 min a 4°C.
9. Remover o etanol invertendo tubo.
10. Adicionar 500µL de etanol a 80% gelado e misturar por inversão.
11. Centrifugar em velocidade máxima por 3 min a 4°C. Remover o etanol residual com a pipeta. Deixar secar por 15 min.
12. Após secar, ressuspender, cuidadosamente, o *pellet* em 50µL de também TE.
13. Adicionar 2µL de RNase a 2mg/mL para ficar numa concentração de 40µg/mL.
14. Incubar em banho-maria a 37°C por 30 min.
15. Armazenar os tubos contendo o DNA em freezer a -20°C.

ANEXO 3 – Protocolo de extração plasmidial pelo kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Primeira Etapa: produção e purificação do DNA plasmidial.

1. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm o material bacteriano crescido em meio LB líquido overnight a 37°.
2. Adicionar 250µl de *Cell Resuspension Solution* (CRS) e ressuspender o pellet por vortex ou pipetagem.
3. Adicionar 250µl de *Cell Lysis Solution* (CLS) e inverter vagarosamente umas 4 vezes (NÃO VORTEXAR).
4. Incubar por 4 minutos.
5. Adicionar 10µl de *Alkaline Protease Solution* e incubar por 4 minutos.
6. Adicionar 350µl de *Neutralization Solution* e inverter imediatamente (vagarosamente) umas 4 vezes.
7. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente.
8. Etiquetar tubo da coluna.

Segunda etapa: obtenção do plasmídeo

9. Transferir o sobrenadante (~850µl) para a coluna com o tudo devidamente etiquetado (sem pegar nenhum precipitado, caso isto ocorra, passar a coluna para um tubo de 1,5ml e centrifugar novamente por 5 minutos).
10. Deixar por 2 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar por 1 minuto, 14.000rpm a temperatura ambiente (desprezar o sobrenadante).
12. Adicionar 750µl de *Collumn Wash Solution*.
13. Centrifugar por 1 minuto, 14.000 rpm a temperatura ambiente (desprezar o sobrenadante).
14. Adicionar 250µl de *Collumn Wash Solution*.
15. Centrifugar por 2 minuto, 14.000 rpm a temperatura ambiente.
16. Transferir a coluna para tubo eppendorf de 1,5ml.

Terceira etapa: eluição do plasmídeo

17. Adicionar 25µl de *Nuclease Free Water*.
18. Centrifugar por 1 minuto, 14.000 rpm a temperatura ambiente.
19. Adicionar 25µl de *Nuclease Free Water*.
20. Centrifugar por 1 minuto, 14.000 rpm a temperatura ambiente.
21. Descartar a coluna.
22. Armazenar o DNA plasmidial extraído a -20°C ou menos.

ANEXO 4 – Protocolo de purificação para produto de PCR (GE Healthcare®)

1. Captura da amostra

- a) Adicionar 100 μ L de tampão de captura 2 em 20 μ L de amostra.
- b) Misture completamente.

2. Ligação da amostra

- a) Centrifugar o mix tampão de captura 2 + amostra brevemente (30 seg) para coletar o líquido do fundo do tubo.
- b) Colocar o mix na coluna e no tubo coletor.
- c) Centrifugar a 12.000 rpm por 30 seg.
- d) Descartar o sobrenadante e recolocar a coluna no tubo coletor.

3. Lavagem e secagem

- a) Adicione 100 μ L de tampão de lavagem tipo 1 (tampa amarela) a coluna.
- b) Centrifugue a 12.000 rpm por 30 seg.
- c) Descare o tubo coletor e transfira a coluna para um tubo eppendorf 1,5mL.

4. Eluição

- a) Adicionar 20 μ L de tampão de eluição tipo 6 no centro da coluna.
- b) Incubar por 1 min a temperatura ambiente.
- c) Centrifugar a 12.00 rpm por 1 min para recuperar o DNA.
- d) Armazenar o DNA purificado a -20°C.

ANEXO 5 – Protocolo de purificação para produto de gel (*GE Healthcare*[®])

1. Captura da amostra

- a) Pesar um tubo 1,5mL livre de DNA e anotar o peso.
- b) Excisar o gel no tamanho do fragmento de interesse e colocá-lo no tubo pesado na etapa anterior.
- c) Pesar o tubo 1,5mL agora com o pedaço do gel e subtrair o valor anterior pelo obtido agora.

Nota: Adicionar 10 μ L de tampão de captura tipo 3 a cada 10mg de gel de agarose.

- d) Misturar por inversão e incubar a 60°C até dissolver completamente a agarose. Misturando por inversão a cada 3 min.
- e) Centrifugar por 1 min a temperatura ambiente.

2. Ligação da amostra

- a) Transferir a mistura para uma coluna, devidamente etiquetada.
- b) Deixar 1 min a temperatura ambiente.
- c) Centrifugar por 1 min a temperatura ambiente.

3. Lavagem e secagem

- a) Adicionar 600 μ L de tampão de lavagem tipo 1 a coluna.
- b) Centrifugar a coluna por 1 min.
- c) Descartar o *collection* tubo e transferir a coluna para um tubo 1,5mL.

4. Eluição

- a) Adicionar 30 μ L de tampão de eluição tipo 6 no centro da membrada da coluna.
- b) Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- c) Centrifugar por 1 min.
- d) Descartar a coluna e guardar o tubo contendo o DNA purificado a -20°C.

ANEXO 6 – Protocolo de purificação com Etanol, EDTA e Acetato de sódio (Bula *Big Dye v3.1* – Applied Biosystem)

Para precipitação de reações com 10 μ L em placa com 26 poços.

1. Remover a placa do termociclador e dar um breve spin (1 min a 2000g).
2. Adicionar 1 μ L de DNA na placa.
3. Adicionar 1 μ L de EDTA 125mM em cada um dos poços.

Nota: Tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços, utilizando uma pipeta para cada poço.

4. Adicionar 1 μ L de acetato de sódio 3M em cada um dos poços.

Nota: Tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços, utilizando uma pipeta para cada poço.

5. Adicionar 25 μ L de etanol 100% a cada um dos poços.
6. Selar a placa com *strips* e misturar por inversão (aproximadamente 4 vezes).
7. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 2000g por 45 min ou 3000xg por 30min.
Importante: O próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, fazer um breve spin na placa por mais 2 min antes de começar o próximo passo.
9. Inverter a placa e fazer um spin até 180RCF por 1 min, removendo em seguida a placa da centrífuga (inverter e retirar o excesso de reagente).
10. Adicionar 35 μ L de etanol 70% gelado em cada poço.
11. Centrifugar por 15 min a 4°C e 1650xg.
12. Inverter a placa e fazer um spin até 180RCF por 1 min, removendo em seguida a placa da centrífuga.
Nota: Começar a contar o tempo assim que o rotor iniciar a rotação.
13. Secar a placa por aproximadamente 15 min,
14. Ressuspender as amostras com 10 μ L de *injection buffer* (Hi-di formamida).
15. Deixar a 95°C por 1 min.
16. Sequenciar.

ANEXO 7 – Sequências obtidas para as bactérias produtoras de ESBL de acordo com cada gene.

TEM-1

Cepa 3 (353pb)

>CTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA
AGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
CTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
GTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG

Cepa 37 (456pb)

>GGGCGTTTCTTTTTTGCGGGTTTTTGCCTTCTGTTTTTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA
GTAAAAGATGCTGACCCTTTGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC
TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTA
TTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG
TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAA
CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTTACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT
GA

SHV-1

Cepa 3 (599pb)

>CCGGGTGGGCTATGTTGAAATGGATCTGGCCAGCGGGCCGACGCTGGCCGCCTGGCGCGCCA
GTGAGCGCTTTCCGCTGATGAGCACCTTTAAAGTGCTGCTCTGCGGCGCGGTGCTGGCCCGGGT
GGATGCCGGCGACGAACAGCTGGATCGGCGGATCCACTACCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTA
CTCCCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGGATGACCGTTGGCGAACTCTGCGCCGCGGC
CATACCATGAGCGACAACACCGCCGGCAATCTGCTGTTGAAGATCGTCGGCGGGCCCCGCGGG
ATTGACCGCTTTTTCTGCGCCAGATCGGTGACAACGTCACCCGTCTTGACCGCTGGGAAACGGAA
CTCAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGTGCGCGACACCACCACCCCGGCCAGCATGGCCACCACC
CTGCGCAAGCTGCTAACCACCCCTCTCTGAGCGCCCGTTTCGCAGCAGCAGCTGCTGCAGTGGA
TGTTGACGACCGGGTGGCCGGCCCGTTGATCCGCGCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCG
CCGATAAAACCGGGGCCGGTGAGCGGGCT

Cepa 4 (562pb)

>AGCTGGCGGGCCGGGTGGGCTATGTTGAAATGGATCTGGCCAGCGGGCCGACGCTGGCCGCC
TGCGCGCCAGTGAGCGCTTTCCGCTGATGAGCACCTTTAAAGTGCTGCTCTGCGGCGCGGTGC
TGCCCGGGTGGATGCCGGCGACGAACAGCTGGATCGGCGGATCCACTACCGCCAGCAGGATC
TGGTGGACTACTCCCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGGATGACCGTTGGCGAACTCTG
CGCCGCGCCATCACCATGAGCGACAACACCGCCGGCAATCTGCTGTTGAAGATCGTCGGCGG
CCCCGCGGGATTGACCGCTTTTTCTGCGCCAGATCGGTGACAACGTCACCCGTCTTGACCGCTGG
GAAACGGAACCAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGTGCGCGACACCACCACCCCGGCCAGCATG
GCCACCACCCTGCGCAAGCTGCTAACCACCCCTCTCTGAGCGCCCGTTTCGCAGCAGCAGCTG
CTGCAGTGGATGGTTGACGACCGGGTGGCCGGCCCGTTGATCCGCGCCGTGCTGCC

Cepa 15 (568pb)

>GGCGGGCCGGGTGGGCTATGTTGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGCTGGCCGCCTGG
 CGCGCCAGTGAGCGCTTTCCGCTGATGAGCACCTTTAAAGTGCTGCTCTGCGGCGCGGTGCTGG
 CCCGGGTGGATGCCGGCGACGAACAGCTGGATCGGCGGATCCACTACCGCCAGCAGGATCTGG
 TGGACTACTCCCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGGATGACCGTTGGCGAACTCTGCGC
 CGCCGCCATCACCATGAGCGACAACACCGCCGGCAATCTGCTGTTGAAGATCGTCGGCGGCC
 CGCGGGATTGACCGCTTTTCTGCGCCAGATCGGTGACAACGTACCCCGTCTTGACCGCTGGGAA
 ACGGAACTCAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGTGCGCGACACCACCACCCCGGCCAGCATGGCC
 ACCACCCTGCGCAAGCTGCTAACCACCCCTCTCTGAGCGCCCGTTCGCAGCAGCAGCTGCTGC
 AGTGGATGGTTGACGACCGGGTGG CCGGCCCGTTGATCCGCGCCGTGCTGCCGGCGGGCTGG

Cepa 17 (519pb)

>CGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCC
 AGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTGC
 GCGAACTCTGTGCCGCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCAC
 CGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGGGACAACGTACCCCGCTT
 GACCGCTGGGAAACGGAACGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGCGACACCCTACCCCG
 GCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTGCAA
 CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTTCGCCGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTG
 TCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTGGCGAACGGGTGCGCGCGGGATTGTC
 GCCCTGCTTGCCCC

CTX-M-15**Cepa 3 (420pb)**

>TATAATCCGATTGAAGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCC
 GCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTA
 GCGTCACCGCGTTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGA
 CGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGAAAC
 TCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATG
 GATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCAAGGTGGTG
 GGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAAC

Cepa 12 (452pb)

>CGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGG
 GACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAAT
 AAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAGAC
 GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTG
 ATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGG
 CGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCAT
 TCAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCAC
 ACCAA

Cepa 13 (455pb)

>AGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAAT
 GGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATG
 AATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGA
 GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGC
 GTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATT
 GGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAG

CATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGC
ACCACCAAC

Cepa 15 (440pb)

>AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACT
GGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCT
CACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGT
CTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCGCGTGATAACCACTTCAC
CTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAAC
GGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGAC
TGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAA

Cepa 17 (454pb)

>AGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAAT
GGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATG
AATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGA
GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCGC
GTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATT
GGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAG
CATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGC
ACCACCAA

Cepa 18 (455pb)

>CAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAA
TGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGAT
GAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGG
AGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCG
CGTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCAT
TGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGA
GCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATG
GCACCACCAA

Cepa 21 (457pb)

>TCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCA
ATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGAT
GAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGG
AGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCG
CGTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCAT
TGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGA
GCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATG
GCACCACCAAC

Cepa 26 (395pb)

>CGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGG
GACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAAT
AAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGAGAC
GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCGCGTG
ATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGG
CGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCAT
TCAGGCTGGACT

Cepa 34 (455pb)

>AGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAAT
 GGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATG
 AATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGA
 GACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGC
 GTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATT
 GGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAG
 CATTACAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGC
 ACCACCAAC

Cepa 37 (512pb)

>GTAAGGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATC
 AGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATG
 GGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGA
 ATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAG
 ACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCG
 TGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTG
 GGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGC
 ATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCA
 CC

Cepa 39 (449pb)

>GTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGAC
 GATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG
 CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAGACGAA
 ACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATA
 CCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGA
 CAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCA
 GGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAC
 CAA

OXA-15**Cepa 12 (656pb)**

>ATTATTTGAAGGAACTGAAGGTTGTTTTTACTTTACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCA
 ATTCATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGCACCAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACT
 TATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAACCATATTCAAATGGGATAAAACCCCAAAGG
 AATGGAGATCTGGAACAGCAATCATAACCAAAGACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTC
 GCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAAAAATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGA
 AATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAG
 CTAAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCAATTCCTGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTT
 AAAAATCAGCCATAGAAAACCCATAGAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAA
 CTGTATGGGAAAACCTGGTGCAAGGATTACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTGAAGG
 GTTTATTATAAGCAAATCAGGACATAAATATGTTTTTGTGTCCGCACTTACAGGAAACTTGG

Cepa 13 (579pb)

>CTGAAGGTTGTTTTTACTTTACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAA
 AGTGTGCAACGCAAATGGCACCAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATG
 CGGAAATAATAGATCAGAAAACCATATTCAAATGGGATAAAACCCCAAAGGAATGGAGATCTGG

AACAGCAATCATAACCAAGACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTGGGTTTCGCAAGAAATAACC
 CAAAAAATTGGATTAATAAAAATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCT
 CTGGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTCA
 CCAGAAGAACAAATTCATTCTGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCC
 ATAGAAAACACCATAGAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAA
 ACTGGTGCAGGATTCACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGTTTGAAG

Cepa 15 (665pb)

>CATCAACAGATATCTACTGTTGCATCTCCATTATTTGAAGGAACTGAAGGTTGTTTTTACTTT
 ACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGCAACGCAAATGGCA
 CCAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAA
 ACCATATTCAAATGGGATAAAAACCCCAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATAACCCAAA
 GACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTGGTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAA
 AATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAC
 AACGGATTACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCATTCC
 TGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACACCATAGAGAACA
 TGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAA
 ATAGAACCTTACAAAACGGATGTTTGAAGGGTTTATTATAAGCAAATCAGGACATAAATATGTTTT
 TGTGT

Cepa 17 (676pb)

>ATCAACAGATATCTACTGTTGCATCTCCATTATTTGAAGGAACTGAAGGTTGTTTTTACTTTA
 CGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGCAACGCAAATGGCAC
 CAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAA
 CCATATTCAAATGGGATAAAAACCCCAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATAACCCAAA
 ACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTGGTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAA
 AATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAC
 ACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCATTCC
 TGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACACCATAGAGAACA
 TGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAA
 ATAGAACCTTACAAAACGGATGTTTGAAGGGTTTATTATAAGCAAATCAGGACATAAATATGTTTT
 TGTGTCCGCACTTACA

Cepa 18 (599pb)

>CTGAAGGTTGTTTTTACTTTACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAA
 AGTGTGCAACGCAAATGGCACCAGATTCACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATG
 CGGAAATAATAGATCAGAAAACCATATTCAAATGGGATAAAAACCCCAAGGAATGGAGATCTGG
 AACAGCAATCATAACCAAGACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTGGGTTTCGCAAGAAATAACC
 CAAAAAATTGGATTAATAAAAATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCT
 CTGGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTCA
 CCAGAAGAACAATTCATTCTGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCC
 ATAGAAAACACCATAGAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAA
 ACTGGTGCAGGATTCACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGTTTGAAGGGTTTATTATAAG
 CAAATCA

Cepa 21 (697pb)

>CTGAAGGTTGTTTTTACTTTACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAA
 AGTGTGCAACGCAAATGGCACCAGATTCACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATG
 CGGAAATAATAGATCAGAAAACCATATTCAAATGGGATAAAAACCCCAAGGAATGGAGATCTGG
 AACAGCAATCATAACCAAGACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTGGGTTTCGCAAGAAATAACC
 CAAAAAATTGGATTAATAAAAATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCT
 CTGGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTCA
 CCAGAAGAACAATTCATTCTGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCC

ATAGAAAACCCATAGAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAA
ACTGGTGCAGGATTCACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGG

Cepa 26 (680pb)

>ATCAACAGATATCTCTACTGTTGCATCTCCATTATTTGAAGGAACTGAAGGTTGTTTTTACTTT-
CGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGCAC
CAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAA
CCATATTCAAATGGGATAAAACCCCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATACACCAAAG
ACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAAAA
ATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACA
ACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCAATTCC
TGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACCCATAGAGAACA
TGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAA
ATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTGAAGGGTTTATTATAAGCAAATCAGGACATAAATATGTTTT
TGTGTCCGCACTTACAGGAAA

Cepa 34 (576pb)

>GATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGCAC
CAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAA
CCATATTCAAATGGGATAAAACCCCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATACACCAAAG
ACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAAAA
ATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACA
ACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCAATTCC
TGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACCCATAGAGAACA
TGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAA
ATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTGAAGGGTTTATTATAAGCAAATCA

Cepa 37 (635pb)

>ATCAACAGATATCTCTACTGTTGCATCTCCATTATTTGAAGGAACTGAAGGTTGTTTTTACTTTA
CGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGCAC
CAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAA
CCATATTCAAATGGGATAAAACCCCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATACACCAAAG
ACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAATAAAA
ATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATTATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACA
ACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCAATTCC
TGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACCCATAGAGAACA
TGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAA
ATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTGAAGGGTTTATTATAA

Cepa 39 (562pb)

>ACTTTACGATGCATCCACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAA
TGGCACCAGATTCAACTTTCAAGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATC
AGAAAACCATATTCAAATGGGATAAAACCCCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATACA
CCAAAGACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTCGCAAGGAAACAGCAATCATACACCAA
GACGTGGATGCAATTTTCTGTTGTTTGGGTTTCGCAAGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGA
AAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCTTAAAAATTTACCAGAAGAACAAT
TCAATTCCTGCGTAAAATTATTAATCACAATCTCCAGTTAAAAACTCAGCCATAGAAAACCCATA
GAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATGGGAAAACCTGGTGCAGGATT
CACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTGA