UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de genes *bla*_{CTX-M} presentes em
Klebsiella spp. isoladas em hospital universitário do Brasil**

EDUARDO CARNEIRO CLÍMACO

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de genes *bla*_{CTX-M} presentes em
Klebsiella spp. isoladas em hospital universitário do Brasil**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Eduardo Carneiro Clímaco

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da
Costa Darini

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Clímaco, Eduardo Carneiro

Caracterização molecular de genes *bla*_{CTX-M} presentes em *Klebsiella* spp. isoladas em hospital universitário do Brasil. Ribeirão Preto, 2006.

88 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Darini, Ana Lúcia da Costa

1. *Klebsiella* spp.. 2. Resistência a antibióticos. 3. β -lactamases CTX-M.

Autor: Eduardo Carneiro Clímaco

Título do trabalho: Caracterização molecular de genes *bla*_{CTX-M} presentes em *Klebsiella* spp. isoladas em hospital universitário do Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa
Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos seguintes centros de pesquisa:

Laboratório Principal: Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da FCFRP-USP.

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana da FMRP – USP, onde foi realizada parte dos experimentos de seqüenciamento, sob a coordenação do *Prof. Dr. Marcelo Brocchi*, atualmente professor doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia – UNICAMP.

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, do Departamento de Genética da FMRP – USP, nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foi realizada parte dos experimentos de seqüenciamento, sob coordenação do *Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior*.

“Vivendo se aprende; mas o que se aprende, mais, é só fazer outras maiores perguntas.”

*(João Guimarães Rosa -
Grande Sertão: Vereda)*

Agradecimentos

À minha amada Juliana Pernambuco,
pelo apoio e companheirismo, pelas alegrias compartilhadas nos momentos felizes e pelas lágrimas divididas nos momentos tristes. Por todo seu amor.

Aos amados pais, Coraci e José Hugo,
pelos valores e virtudes ensinados, pelo amor e harmonia cultivada em nossa família.

Aos amados irmãos, Rodolfo e Rachel,
pelo carinho e pela nossa união.

À Sra. Lélia Pernambuco e ao Sr. Juscelino Pernambuco,
que me acolheram como uma segunda família.

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia da Costa Darini,
pela oportunidade concedida e pelos ensinamentos valiosos. Expresso a minha admiração e enorme gratidão.

À Izabel Cristina Vanzato Palazzo,
pela grande amizade e pelo apoio e contribuição no trabalho.

Aos amigos Luciene e Paulo,
pela amizade sincera, além da força e estímulos durante o mestrado.

Aos amigos do LEBEM, André, Priscila, Amanda, Léo, Joseane, Rubinho e Natália pelas participações no trabalho, pelos risos e pelas amizades formadas.

Aos amigos André Bussade, Diego e Mário,

pela companhia e por me aturarem como colega de república.

Ao Dr. Jorge Sampaio,

por ter cedido linhagens bacterianas utilizadas como controle.

À Adriana Aparecida Márquez,

pelos exaustivos seqüenciamentos.

Ao CNPq,

pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Nos campos da observação, o
acaso favorece apenas as mentes
preparadas.”*

(Louis Pasteur)

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Família CTX-M.....	3
1.1.1. Histórico.....	3
1.1.2. Filogenia e origem.....	5
1.1.3. Propriedades genéticas.....	8
1.1.4. Epidemiologia.....	12
1.1.4.1. CTX-M na América do Sul.....	14
1.1.5. Importância das enzimas CTX-M.....	15
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Linhagens bacterianas.....	20
3.2. Linhagens controle.....	20
3.3. Armazenamento das bactérias.....	21
3.4. Extração de DNA genômico bacteriano.....	22
3.5. Amplificação de fragmentos de DNA.....	23
3.5.1. Condições para a reação de amplificação.....	26
3.5.2. Eletroforese em gel de agarose.....	27
3.6. Sequenciamento.....	28
3.7. Determinação do ponto isoeletrico.....	28
3.8. Conjugação.....	29
3.9. Análise do perfil plasmideal.....	30
3.10. Localização do gene <i>bla</i> _{CTX-M} no genoma bacteriano.....	31
3.10.1. Transferência do DNA plasmideal para a membrana de náilon.....	31

3.10.2. Preparo da sonda marcada com digoxigenina.....	32
3.10.3. Reação de hibridação.....	32
3.11. Eletroforese em campo pulsado.....	34
3.12. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	36
4. Resultados.....	37
4.1. Reação em cadeia da polimerase	38
4.2. Sequenciamento.....	40
4.3. Determinação do ponto isoeletrico.....	42
4.4. Conjugação.....	43
4.5. Análise do perfil plasmideal.....	44
4.6. Reação de hibridação.....	48
4.7. Eletroforese em campo pulsado.....	48
4.8. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	50
5. Discussão.....	53
6. Conclusões.....	64
7. Referências.....	67
Apêndices.....	78
Anexos.....	84

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Centígrados
A	Adenina
ATCC	<i>“American Type Culture Collection”</i>
BCIP	Cloreto de p-nitro azul tetrazólico
BHI	<i>“Brain Heart Infusion”</i>
C	Citosina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>“Clinical and Laboratory Standards Institute”</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CS	<i>“Conserved segment”</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
dTTP	Desoxitimina trifosfatado
dUTP	Desoxiuracil trifosfatado
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ES	EDTA, sarcosil e água
ESBL	<i>“Extended-spectrum β-lactamase”</i>
Etest	<i>“Epsilometer test”</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
G	Guanina

GES	Solução de tiocianato de guanidina, EDTA e sarcosil
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCl	Ácido clorídrico
IS	<i>“Insertion sequence”</i>
Kb	Quilobases
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
M	Molar
mA	Miliampéres
mBar	Milibar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol dissódico
NCTC	<i>“National Collection of Type Cultures”</i>
ng	Nanograma
ORF	<i>“Open reading frame”</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>“Polymerase chain reaction”</i>
PFGE	<i>“Pulsed field gel electrophoresis”</i>
pH	Potencial de hidrógeno iônico
pI	Ponto isoelétrico
pmol	Picomol

rpm	Rotações por minuto
SENTRY	Programa de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos
SDS	<i>“Sodium dodecyl sulfate”</i>
SRI	Sequência repetida e invertida
T	Timina
TBE	Tris, EDTA, ácido bórico e água
TE	Tris, EDTA e água
Tris	Hidroximetil amino metano
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
V	volts
X	Vezes
β	beta

Lista de Figuras

Figura 1	Dendrograma das enzimas da família CTX-M.....	6
Figura 2	Esquematização do gene <i>bla</i> _{CTX-M} associado ao elemento de inserção <i>ISEcp1</i>	9
Figura 3	Esquemas de integrons de classe I.....	11
Figura 4	Incidência de enzimas CTX-M no mundo.....	13
Figura 5	Representação esquemática das reações de amplificação de fragmentos de DNA por PCR.....	25
Figura 6	Gel de agarose 1% após eletroforese contendo os produtos amplificados das linhagens de <i>Klebsiella</i> spp. por PCR, usando os <i>primers</i> MA1 e MA2.....	38
Figura 7	Esquematização dos genes seqüenciados nas linhagens de <i>Klebsiella</i> spp. produtoras de CTX-M.....	42
Figura 8	Perfil plasmideal das linhagens de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de CTX-M-2, após eletroforese em gel de agarose 0,8%.....	45
Figura 9	Perfil plasmideal das linhagens de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de CX-M-2 e das respectivas linhagens transconjugantes, após eletrofores em gel de agarose 0,8%.....	45
Figura 10	Perfil plasmideal das linhagens de <i>K. oxytoca</i> produtoras de CTX-M-9, após eletroforese em gel de agarose 0,8%.....	46
Figura 11	Perfil plasmideal das linhagens de <i>K. oxytoca</i> produtoras de CTX-M-9 e das respectivas linhagens transconjugantes, após eletroforese em gel de agarose 0,8%.....	47
Figura 12	Perfil de macrorrestrrição do DNA genômico das linhagens de <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i> produtoras de CTX-M após digestão com a enzima de restrição <i>XbaI</i> e PFGE.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados referentes às linhagens controle utilizadas neste estudo.....	21
Tabela 2	Pares de <i>primers</i> utilizados no estudo.....	24
Tabela 3	Resultados da caracterização dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} e PFGE obtidos nas linhagens de <i>K. oxytoca</i>	39
Tabela 4	Resultados da caracterização dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} e PFGE obtida ns linhagens de <i>K. pneumoniae</i>	40
Tabela 5	Resultado da CIM para as linhagens receptoras, doadoras e transconjugantes.....	52

Resumo

Entre as β -lactamases, as enzimas CTX-M têm despertado atenção especial pela alta incidência e grande capacidade de propagação. Eventos como recombinação gênica, transferência plasmideal e multirresistência podem ser a razão da manutenção e da ampla disseminação dos genes *bla*_{CTX-M}. Este é um trabalho retrospectivo que teve como objetivo caracterizar genes *bla*_{CTX-M} presentes em *Klebsiella* spp. Foram estudadas 27 linhagens de *Klebsiella pneumoniae* e 8 linhagens de *Klebsiella oxytoca*, produtoras de β -lactamase de espectro estendido, isoladas de pacientes hospitalizados no período de janeiro a junho de 2000. A detecção e identificação dos genes *bla*_{CTX-M}, assim como dos elementos relacionados com a mobilização destes genes, foi realizada por PCR e seqüenciamento. A localização genética e a mobilidade dos genes *bla*_{CTX-M} foram pesquisadas por análise plasmideal e hibridação e por conjugação. Os perfis de sensibilidade das linhagens estudadas e das linhagens transconjugantes foram comparados pela determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos das classes das cefalosporinas, cefamicinas, aminoglicosídeos e quinolonas. Foram encontrados genes *bla*_{CTX-M} em plasmídeos conjugativos em 13 (37%) linhagens estudadas: *bla*_{CTX-M-9} em 4 *K. oxytoca*, e *bla*_{CTX-M-2} em 9 *K. pneumoniae*. Os genes *bla*_{CTX-M-9} estavam associados ao elemento de inserção *ISEcp1*, enquanto os genes *bla*_{CTX-M-2} estavam associados a integrons de classe I contendo *ISCR1*. O genes *bla*_{CTX-M-2}, carregado por plasmídeo, pode estar relacionado com disseminação horizontal entre vários clones de *K. pneumoniae*, enquanto o gene *bla*_{CTX-M-9} foi encontrado sendo carregado por um único clone de *K. oxytoca*. Este estudo determinou a incidência e a diversidade de enzimas CTX-M no período estudado, além de fornecer dados epidemiológicos que podem explicar a sua prevalência no mundo e contribuir para o entendimento e controle da disseminação deste tipo de resistência.

Abstract

CTX-M enzymes, the world's most prevalent β -lactamases disseminate very easily. Genetic recombination, plasmid transference and multiresistance could be responsible for the wide spread of *bla*_{CTX-M-X} genes. This retrospective study aims to characterize *bla*_{CTX-M} genes found in *Klebsiella* spp. The strains were isolated in hospital patients from January to June 2000 and consisted of 27 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and 8 ESBL-producing *Klebsiella oxytoca*. PCR and sequencing were used in the detection and identification of *bla*_{CTX-M} genes and genetic elements associated with their mobilization. Determination of genetic localization and mobility of *bla*_{CTX-M} genes was by plasmid analyses, hybridization and transfer assays. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of cephalosporins, cefamicins, aminoglycosides and quinolone antimicrobials evaluated the antibiotic susceptibility profile of transconjugants and strains in the study. The *bla*_{CTX-M} genes were found in 13 strains (37%): *bla*_{CTX-M-9} in 4 *K. oxytoca* and *bla*_{CTX-M-2} in 9 *K. pneumoniae*. The insertion sequence *ISEcpI* was associated with *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CTX-M-2} was found in a class I integron bearing *ISCR1*. Plasmid *bla*_{CTX-M-2} genes dissemination was due to horizontal transfer among many *K. pneumoniae* clones, while *bla*_{CTX-M-9} dissemination was associated with a particular clone of *K. oxytoca*. The study characterized incidence and diversity of CTX-M enzymes during the period studied. Moreover it showed epidemiological data, which may explain CTX-M prevalence worldwide and contribute for the understanding and control of the resistance spread.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, em bactérias Gram-negativas. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando a ação de vários antibióticos pertencentes a esta classe.

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended spectrum β -lactamase*) obtiveram maior destaque a partir da década de 80, quando cefalosporinas de amplo espectro, como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona foram usadas exaustivamente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Este fato foi o principal responsável pelo surgimento e aumento da incidência de bactérias produtoras de ESBL, ou seja, enzimas que hidrolisam antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro (BONNET, 2004).

As ESBL são enzimas muito heterogêneas, apresentando 20% a 90% de similaridade entre as suas seqüências de aminoácidos (BONNET, 2004).

As primeiras enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido foram descritas nos anos 80 e pertenciam às famílias TEM e SHV. Estas enzimas, normalmente codificadas por genes plasmideais, se originaram e tiveram o seu espectro de ação estendido, após mutações em genes cromossômicos que codificam β -lactamases clássicas como TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (FIETT et al., 2000). Ambas as famílias são de ocorrência mundial e geralmente conferem, ao microrganismo que as produz, maior nível de resistência à ceftazidima do que à cefotaxima (BONNET, 2004). A partir da década passada, várias enzimas apresentando maior atividade contra cefotaxima do que contra ceftazidima têm sido reportadas com frequência cada vez maior. Dentre estas, as mais importantes são pertencentes à família CTX-M (BAUERNFEIND et al., 1996b; BERNARD et al., 1992; BONNET et al., 2000a; TZOUVELEKIS et al., 2000). Entretanto, há exceções de enzimas CTX-M que exibem atividade enzimática aumentada contra ceftazidima, como CTX-M-15, CTX-M-16,

CTX-M-19 e CTX-M-27 (BONNET et al., 2001; BONNET et al., 2003; KARIM et al., 2001; POIREL et al., 2001).

O potencial das enzimas CTX-M em hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido é uma característica intrínseca da família, e não resultante de mutações em enzimas precursoras, como é o caso das enzimas TEM e SHV. Outra característica peculiar da família CTX-M é que, ao contrário das outras duas famílias, as enzimas possuem sensibilidade *in vitro* quase dez vezes maior ao inibidor de β -lactamase tazobactam do que ao ácido clavulânico (BUSH et al., 1993).

As primeiras CTX-M foram relatadas em 1989 e, a partir da metade do século passado, estas enzimas demonstraram grande potencial de disseminação, principalmente entre espécies de enterobactérias (BAUERNFEIND et al., 1996a; GNIADKOWSKI et al., 1998; RADICE et al., 2002). Desde então, tem havido um drástico aumento do número de CTX-M e da frequência de isolamento de bactérias produtoras destas enzimas, se tornando as ESBL mais frequentes em todo o mundo, tanto em bactérias de origem hospitalar quanto da comunidade (BONNET, 2004).

1.1. Família CTX-M

1.1.1. Histórico

A década de 90 foi marcante quanto à identificação de ESBL não pertencentes às famílias TEM e SHV. As primeiras bactérias, isoladas de humanos, produtoras de CTX-M foram relatadas na Alemanha e na Argentina e receberam essa nomenclatura devido à capacidade destas enzimas em hidrolisar preferencialmente o antibiótico cefotaxima.

Na Alemanha, Bauernfeid, Grimm e Schweighart, em 1989, relataram uma linhagem de *E. coli* isolada de espécime clínico e que produzia uma enzima denominada CTX-M-1 que conferia maior resistência à cefotaxima do que à ceftazidima (BAUERNFEID; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990). Posteriormente, em 1992, essa mesma enzima foi identificada em outra linhagem de *E. coli* isolada na França (BARTHÉLÉMY et al., 1992; BAUERNFEIND et al., 1996a)

No final da década de 80, houve uma epidemia de salmonela resistentes a altos níveis de cefotaxima na Argentina. A ESBL responsável por esta resistência foi posteriormente identificada e denominada de CTX-M-2 (BAUERNFEIND et al., 1992). Em 1995, no Japão, foi descrita a produção da mesma enzima, porém por linhagens de *E. coli* resistentes à cefotaxima (ISHII et al., 1995; BAUERNFEIND et al., 1996a).

Desde então, várias enzimas da família CTX-M foram identificadas em várias espécies bacterianas, principalmente naquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Novas variantes de CTX-M têm sido mundialmente relatadas (BRADFORD et al., 1998; CAO et al., 2002; KARIM et al., 2001; OLIVER et al., 2001; POIREL et al., 2001), inclusive no Brasil. Bonnet e colaboradores (2000) descreveram uma nova enzima da família das CTX-M, a enzima CTX-M-8, produzida por três espécies de enterobactérias isoladas no Rio de Janeiro: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus* (BONNET et al., 2000b). Em 2001, Bonnet e colaboradores descreveram uma nova enzima, variante da CTX-M-9, produzida por uma linhagem de *E. coli* e que foi nomeada CTX-M-16 (BONNET et al., 2001).

1.1.2. Filogenia e origem

Atualmente, a família CTX-M é formada por cerca de 60 enzimas, que são separadas em cinco grupos, de acordo com a similaridade das seqüências de aminoácidos: grupo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Entre as enzimas de um mesmo grupo, o percentual de identidade é igual ou superior a 94%, enquanto que, entre enzimas pertencentes a grupos diferentes esta percentagem é inferior a 90% (BONNET, 2004). A seguir, estão detalhadas as enzimas CTX-M em seus respectivos grupos:

Grupo CTX-M-1:	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-34, CTX-M-36, CTX-M-37, CTX-M-42, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-54, CTX-M-55, CTX-M-57 e UOE-1.
Grupo CTX-M-2:	CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-31, CTX-M-35, CTX-M-43 e CTX-M-44.
Grupo CTX-M-8:	CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63.
Grupo CTX-M-9:	CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-38, CTX-M-45, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50 e CTX-M-51.
Grupo CTX-M-25:	CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39 e CTX-M-41.

Figura 1. Dendrograma das enzimas da família CTX-M.

A enzima CTX-M-45 é uma integrante do grupo CTX-M-9, porém ela foge à regra de agrupamento. A enzima CTX-M-45 apresenta apenas 86,3% a 88,0% de identidade com as demais enzimas deste grupo, apesar disso, ela é agrupada nele, pois, de acordo com a sequência de nucleotídeos, o gene *bla*_{CTX-M-45} é variante do gene *bla*_{CTX-M-9} e apresenta 98,1% a 98,5% de identidade com os genes que codificam as enzimas do grupo CTX-M-9 (Figura 1). A baixa similaridade entre as enzimas deste grupo e a CTX-M-45 é devido à deleção de seis nucleotídeos o que altera muito a estrutura primária da proteína traduzida (BONNET, 2004; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2004).

Pelo motivo das enzimas CTX-M apresentarem similaridade elevada com β -lactamases produzidas intrinsecamente por várias espécies do gênero *Kluyvera*, e das sequências adjacentes aos genes que codificam essas enzimas serem, em alguns casos, semelhantes às sequências vizinhas de alguns genes *bla*_{CTX-M}, esses genes cromossômicos devem representar os prováveis progenitores dos genes *bla*_{CTX-M}. Em alguns casos, a alta similaridade encontrada entre certos grupos de CTX-M e determinada β -lactamase cromossômica de *Kluyvera* spp. permite apontar a origem comum do grupo.

Rodríguez e colaboradores (2004) relataram a presença do gene *bla*_{CTX-M-3} no cromossomo de uma linhagem de *Kluyvera ascorbata*, esse gene já tinha sido encontrado apenas em plasmídeos de enterobactérias produtoras de CTX-M-3. A enzima CTX-M-3 é uma integrante do grupo CTX-M-1, portanto, esses dados sugerem que essa enzima é o provável ancestral deste grupo.

A sequência de aminoácidos das enzimas do grupo CTX-M-2 se assemelha muito à sequência de aminoácidos da β -lactamase cromossômica da espécie *Kluyvera ascorbata*, com índice de similaridade de 94,5% a 100%, indicando que a origem das enzimas do grupo CTX-M-2 é provavelmente a β -lactamase KLUA (BONNET, 2004; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2004).

A enzima CTX-M-8 possui identidade de 99% com a KLUG-1, uma β -lactamase cromossômica de *Kluyvera georgiana*, sugerindo que esta enzima representa a origem genética deste grupo.

O provável progenitor das enzimas da família CTX-M-9 é a β -lactamase KLUY-1 produzida por uma linhagem de *Kluyvera georgiana* que apresentava o gene *bla*_{KLUY-1} em seu cromossomo. A sequência de aminoácidos da enzima KLUY-1 tem 100% de identidade com a CTX-M-14, uma ESBL pertencente ao grupo CTX-M-9; estes dados sustentam a hipótese da origem genética deste grupo (OLSON et al., 2005).

Até o momento, não foi encontrada uma enzima que pudesse ser considerada o ancestral das enzimas do grupo CTX-M-25. A β -lactamase cromossômica mais similar às enzimas do grupo CTX-M-25 é a KLUG-1 (89,4% a 89,7%), sugerindo que essas CTX-M foram originadas provavelmente por alguma enzima variante da KLUG-1 ou por outra β -lactamase produzida intrinsecamente por espécies de *Kluyvera* (VILLEGAS et al., 2004; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2004).

1.1.3. Propriedades genéticas

Os genes *bla*_{CTX-M} estão geralmente associados a plasmídeos, de tamanhos que variam de 7kb a 160kb, e estão inseridos em transposons ou em integrons. Outros genes, como o *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2}, genes *bla*_{OXA} e *bla*_{SHV}, que conferem resistência a antibióticos β -lactâmicos, são freqüentemente encontrados no mesmo plasmídeo. Além destes genes, esses plasmídeos, muito freqüentemente, carregam genes de resistência a outras classes de antibióticos: aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclina. Este fato deve facilitar a sobrevivência de bactérias produtoras de ESBL sob pressão seletiva de diversos antibióticos (CANTÓN; COQUE, 2006).

Estudos moleculares das regiões genéticas que se encontram os genes *bla*_{CTX-M} demonstram que esses genes estão envolvidos em diversos processos de recombinação gênica. Diferentes seqüências de inserção podem estar relacionadas com a grande mobilização e disseminação desses genes. Entre elas, as mais freqüentes são a *ISEcp1* e a *ISCRI*.

A seqüência de inserção *ISEcp1* tem sido observada à montante (de 42 a 266 pb) de diversos genes *bla*_{CTX-M}, principalmente daqueles que codificam as enzimas CTX-M-1, 2, 3, 9, 13, 14, 15, 17, 19, 20 e 21 (Figura 2). Este elemento de inserção é formado por uma região *tnpA* que codifica uma transposase, flanqueada por duas seqüências repetidas e invertidas: IRR e IRL, (do inglês *right inverted repeats* e *left inverted repeats*) (LARTIGUE; POIREL; NORDMANN, 2004; SALADIN et al., 2002). Este elemento está envolvido na mobilização do gene *bla*_{CTX-M} por um mecanismo de “transposição por uma única extremidade”. Neste tipo de transposição, a transposase tem especificidade apenas por uma seqüência IRL, enquanto seqüências diferentes podem ser reconhecidas como sítios IRR. Portanto, dependendo da seqüência reconhecida pela transposase como sítio IRR, o fragmento mobilizado pode apresentar diferentes tamanhos e conter diferentes genes. Além do processo de mobilização, o elemento *ISEcp1* também participa da expressão dos genes *bla*_{CTX-M} por apresentar uma região promotora capaz de induzir fortemente a expressão de genes adjacentes (Figura 2) (POIREL et al., 2005).

Figura 2. Esquematização do gene *bla*_{CTX-M} associado ao elemento de inserção *ISEcp1*. O sítio de recombinação IRL e vários sítios IRR estão destacados.

O outro elemento genético bastante relacionado com a mobilização de genes *bla*_{CTX-M}, principalmente genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, é a *ISCR1*. Porém, este elemento também exerce papel de mobilização de outros genes de resistência tais como *catAII* (resistência ao clorafenicol); *dfrA10*, *dfrA23*, *dfrA3b*, *dfrA19* (resistência ao trimetoprim); *armA* (resistência aos aminoglicosídeos), *qnrA* (resistência às quinolonas) (CANTÓN; COQUE, 2006).

Anteriormente chamada de *orf513*, *ISCR1* pertence à família de seqüências de inserção *IS91-like*, que são capazes de mobilizar seqüências de DNA adjacentes por um mecanismo de transposição incomum denominado em inglês *rolling-circle replication*. Os elementos *IS91-like*, diferentemente das demais IS, não possuem seqüências terminais repetidas e invertidas (IRR e IRL), porém apresentam nas extremidades duas seqüências completamente diferentes uma da outra, a *oriIS* e a *terIS*, que participam como sítios de reconhecimento no processo de translocação (TOLEMAN et al., 2006).

Quase sempre o elemento *ISCR1*, juntamente com os genes mobilizados por ele, aparece fazendo parte de complexos integrons de classe 1. Normalmente, os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9} têm sido associados aos integrons InS21, In35 e In60 (Figura 3) (ARDUINO et al., 2002; AYALA et al., 2002; SABATE et al., 2000).

Integrons são elementos genéticos que contêm sítios específicos capazes de modular a integração e excisão, assim como a expressão de cassetes gênicos. Cassetes gênicos são genes, normalmente de resistência a antibióticos, circularizados e de aproximadamente 600 pb, que carecem de promotores e são ligadas a uma seqüência responsável pela integração destes cassetes de genes nos integrons (FLUIT; SCHMITZ, 2004).

Os integrons relacionados com o gene *bla*_{CTX-M} são compostos por um segmento conservado 5' (5'CS) e por uma duplicação do segmento conservado 3' (3'CS). No segmento conservado 5', é encontrado o gene *int* que codifica uma integrase e adjacente a este gene, há um sítio de recombinação *attI* (FLUIT; SCHMITZ, 2004). Nos segmentos conservados 3' são

encontrados o gene *qacEΔ1*, que confere resistência ao brometo de etídio e aos compostos de amônio quartenário; e o gene *sul1*, que confere resistência às sulfonamidas (LÉVESQUE et al., 1995). Entre o segmento 5'CS e o primeiro 3'CS, existe uma região onde são integrados os cassetes de genes, que, na maioria das vezes, conferem resistência a antibióticos e a desinfetantes (Figura 3) (BONNET, 2004; ECKERT et al., 2003).

Figura 3. Esquemas de integrons de classe I. A – Gene *bla_{CTX-M-2}* inserido ao integron de classe I InS21 e In35.

B – Gene *bla_{CTX-M-9}* inserido no integron de classe I In60. Baseado em Bonnet, 2004.

Após a primeira região 3'CS existe uma região conservada, uma região variável e uma segunda região 3'CS. A região conservada possui 2100pb e inclui o elemento *ISCR1* enquanto a sequência mobilizada pelo *ISCR1* é representada pela região variável e pela segunda região 3'CS (Figura 3). Na região variável tem sido observada a inserção de vários genes, entre eles genes *bla_{CTX-M}*. Nos integrons InS21 e In35, essa região variável é formada pelo gene de resistência *bla_{CTX-M-2}* e pela *orf3*, de função desconhecida (Figura 3-A) (ARDUINO et al., 2002; AYALA et al., 2002). No integron In60, essa região é formada pelo gene *bla_{CTX-M-9}*, por um elemento *orf3-like*, de função desconhecida, e por um elemento de

inserção *IS3000* (Figura 3-B) (SABATE et al., 2000). Outros genes de resistência têm sido observados na região variável de outros integrons (BONNET, 2004).

Acredita-se que essa estrutura atípica dos integrons de classe 1 contendo *ISCR1* e uma duplicação da região 3'CS é resultado de uma série de processos recombinatórios, no qual se inicia com a inserção da *ISCR1* à montante da região 3'CS de algum integron. A partir de então, esse elemento mobiliza a sequência anterior a ele, incluindo a região 3'CS, formando uma estrutura circular livre e posterior recombinação com um segundo integron (TOLEMAN et al., 2006).

Outros elementos genéticos, diferentes do *ISEcp1* e da *ISCR1*, também podem estar relacionados com a mobilização de genes *bla*_{CTX-M}, porém são bastante raros. Como é o caso da *IS10* e da *IS26* associadas, respectivamente, aos genes *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-1}, e como o elemento *IS903* observado próximo aos genes *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-17} (BONNET et al., 2000b; PAI et al., 2001; SALADIN et al., 2002).

1.1.4. Epidemiologia

Durante a década de 90, as ESBL mais prevalentes no mundo eram da família TEM e SHV. Essas enzimas apresentavam um perfil epidêmico relacionado a surtos de bactérias de origem hospitalar. As enzimas CTX-M eram raramente encontradas e, a sua presença só era investigada quando a bactéria apresentava maior nível de resistência à cefotaxima do que à ceftazidima, fato que é característico da maioria das linhagens produtoras de CTX-M. O quadro da incidência de ESBL no mundo tem sofrido alterações drásticas nos últimos anos. O novo cenário epidemiológico destaca a prevalência das enzimas da família CTX-M, tanto em bactérias hospitalares quanto isoladas na comunidade, com perfil pandêmico. O aumento da incidência de CTX-M está relacionado tanto com a disseminação de múltiplos clones, quanto

com a disseminação de diversos elementos genéticos que carregam os genes *bla*_{CTX-M} (CANTÓN; COQUE, 2006).

As β -lactamases CTX-M são comumente produzidas por espécies de enterobactérias, principalmente *E. coli*, mas também há relatos em *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio cholerae* e *Aeromonas hydrophila*.

Casos de bactérias produtoras de CTX-M têm sido relatados em todo o mundo, porém a disseminação destas enzimas tem sido observada mais severamente em três principais áreas geográficas: Europa e Ásia e América do Sul. Curiosamente, os EUA ainda apresentam casos esporádicos destas enzimas (Figura 4) (CANTÓN; COQUE, 2006). A Figura 4 demonstra a situação atual da disseminação das enzimas da família CTX-M no mundo.

Algumas enzimas se apresentam difundidas em alguns países, como a CTX-M-9 e CTX-M-14 na Espanha, a CTX-M-1 na Itália e CTX-M-2 na Argentina. Outras, como a CTX-M-15, são encontradas disseminadas por todo o mundo (Figura 4) (CANTÓN; COQUE, 2006).

Figura 4. Incidência de enzimas CTX-M no mundo. Baseado em Cantón e Coque, 2006.

1.1.4.1. CTX-M na América do Sul

São escassos os dados estatísticos da incidência e da diversidade de ESBL produzidas por bactérias isoladas no Brasil. Além disso, trabalhos epidemiológicos representativos do território brasileiro são bastante dificultados pela necessidade de uma amostragem ampla. De acordo com alguns dados obtidos isoladamente, aproximadamente 9% de *E. coli* e 50% de *K. pneumoniae* foram caracterizadas como produtoras de ESBL (OPLUSTIL et al., 2001; SADER et al., 1999). De acordo com um estudo do SENTRY (Programa de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos) realizado em 2001, 48% das *K. pneumoniae* produtoras de ESBL produziam enzimas CTX-M (SADER et al., 2001).

De acordo com alguns estudos, é provável que exista uma grande diversidade de enzimas CTX-M no Brasil (BONNET, 2004). Foram estudadas 18 amostras de enterobactérias produtoras de ESBL coletadas entre 1998 e 1999 no Brasil, e foram detectadas seis enterobactérias produtoras de enzimas CTX-M. As β -lactamases da família SHV ($n^{\circ}=10$) foram as predominantes neste estudo, seguidas pelas β -lactamases da família CTX-M. É importante relatar a grande variedade de CTX-M encontrada: CTX-M-2 em *P. mirabilis*, CTX-M-9 e CTX-M-16 em *E. coli* e CTX-M-8 em *Citrobacter amalonaticus*, *E. cloacae* e *Enterobacter aerogenes*. Deve-se ressaltar ainda, que os relatos das enzimas CTX-M-8 e CTX-M-16 foram os primeiros no mundo (BONNET et al., 2000a; BONNET et al., 2000b; BONNET et al., 2001; BONNET, 2004). Portanto, apesar de escasso, os dados indicam que deve haver uma prevalência elevada das enzimas CTX-M no Brasil.

Um dos primeiros relatos das enzimas CTX-M ocorreu na Argentina. Os estudos demonstraram que a incidência da enzima CTX-M foi cerca de 75% entre espécies de enterobactérias produtoras de ESBL (RADICE et al., 2002) e, na maioria das vezes, envolvendo a enzima CTX-M-2 (QUINTEROS et al., 2003). Os trabalhos relataram também a

produção desta enzima por outras bactérias não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* como *Aeromonas hydrophyla* e *Vibrio cholerae* (RADICE et al., 2002).

Segundo Villegas et al. (2004), a incidência, na Colômbia, de *E. coli* e *K. pneumoniae* fenotipicamente produtoras de ESBL foi de 11,8% e 32,6%, respectivamente. A caracterização molecular destas enzimas demonstrou que a principal família de ESBL encontrada foi a CTX-M.

1.1.5. Importância das enzimas CTX-M

A resistência a antimicrobianos entre os vários gêneros bacterianos representa uma preocupação mundial. Para alguns estudiosos, a situação atual caminha para o que foi vivenciado na era pré-antibiótico, devido à rapidez com que vários gêneros bacterianos desenvolvem resistência a antibióticos considerados de última geração. Este panorama de multirresistência e, conseqüentemente, de poucas opções terapêuticas se faz presente entre membros da família *Enterobacteriaceae*.

Como mencionado anteriormente, a produção de ESBL é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em enterobactérias, e destas, as enzimas da família CTX-M são as predominantes. Os genes *bla*_{CTX-M} demonstram extrema facilidade de disseminação, porém, ainda não se conhece completamente os fatores que levam a isso. Acredita-se que esta grande disseminação é um processo adaptativo que resulta de várias características destes genes: a associação destes genes a elementos genéticos que modulam a sua mobilidade, como as *ISEcp1* e *ISCR1*, tornando-as seqüências facilmente recombináveis; a relação destes genes a plasmídeos conjugativos e transposons, o que possibilita a disseminação horizontal destes genes entre diversas espécies de bactérias; a co-existência destes genes com genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos em uma mesma estrutura genética

(transposons, integrons, plasmídeos), tornando-os mais aptos a se manterem sob pressão seletiva de diversos antimicrobianos como aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamida.

As enzimas ESBL da família CTX-M que, apesar de serem as principais responsáveis pela resistência a β -lactâmicos, até o momento, ainda são pouco estudadas no Brasil. Os raros trabalhos investigando as enzimas CTX-M no Brasil relatam a presença e sugerem a existência de vários tipos destas enzimas. Além disso, os trabalhos com amostras originadas de países vizinhos ao Brasil, como a Argentina e Colômbia, relataram uma alta incidência de CTX-M.

Estes indícios de haver predominância e grande diversidade de enzimas CTX-M no Brasil tornam os estudos de caracterização molecular altamente recomendáveis para a elucidação da epidemiologia e da origem genética destas enzimas. Esses dados são extremamente valiosos para o controle da disseminação deste tipo de resistência.

Além disso, a constatação de uma alta incidência de cefotaximase alertará os laboratórios de rotina para a necessidade de utilização de cefotaxima como mais um substrato para a detecção de enzimas ESBL. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a utilização de apenas ceftazidima como substrato na pesquisa de produção de ESBL era suficiente para a detecção da grande maioria das β -lactamases de espectro estendido. Esta realidade tem mudado e isso tem um grande efeito prático no tratamento correto das infecções causadas por bactérias produtoras dessas enzimas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ❖ Caracterizar os genes *bla*_{CTX-M} presentes em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de ESBL, isoladas em 2000 no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, relacionando-os com a localização genética e com o perfil bacteriano de sensibilidade a antimicrobianos.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Determinar a incidência de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de CTX-M no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto entre janeiro e junho de 2000
- ❖ Investigar a diversidade de enzimas CTX-M presentes nas bactérias estudadas
- ❖ Detectar a presença de possíveis mutações, descritas ou não, no gene *bla*_{CTX-M}
- ❖ Definir a localização genética dos genes *bla*_{CTX-M}
- ❖ Identificar as Sequências de Inserção associadas aos genes *bla*_{CTX-M}
- ❖ Correlacionar a presença de genes *bla*_{CTX-M} em *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* com o perfil de sensibilidade destas bactérias a antimicrobianos
- ❖ Investigar a disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} entre as linhagens estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas 35 linhagens de *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL (27 *K. pneumoniae* e 8 *K. oxytoca*), selecionadas em estudo prévio (CNPq processo nº 475482/01-8), realizado no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP) (Anexos A, B, C e D ; GUIMARÃES, 2003).

Estas bactérias foram isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de janeiro a junho de 2000. A identificação e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram previamente realizados pelo aparelho MicroScan[®] (Walk-Away[™] ≡ 40/99 – Dade Bering, Alemanha), por método enzimático/colorimétrico. A produção de ESBL foi confirmada por Disco Combinado e Etest[®] ESBL (Anexos A e B).

3.2. Linhagens controle

As linhagens controle utilizadas neste estudo, com as respectivas características que justificaram sua utilização, estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados referentes às linhagens controle utilizadas neste estudo

LINHAGEM CONTROLE	CARACTERÍSTICA	EXPERIMENTO
<i>E. coli</i> K12 C600	resistente à estreptomicina	Receptora em conjugação
<i>E. coli</i> J53 AzR	resistente à azida sódica	Receptora em conjugação
<i>E. coli</i> V517 (NCTC 50193)	tamanhos de plasmídeos conhecidos	Extração e análise de plasmídeos
<i>E. coli</i> 39R861 (NCTC 50192)	tamanhos de plasmídeos conhecidos	Extração e análise de plasmídeos
<i>E. coli</i> ATCC 25922	padrão de sensibilidade	Determinação da CIM
<i>E. coli</i> RJ-15317	produtora de CTX-M-2	PCR
<i>E. aerogenes</i> RJ-159835	produtora de CTX-M-8	PCR
<i>E. cloacae</i> RJ-36546	produtora de CTX-M-8	PCR
<i>E. coli</i> RJ-24694	produtora de CTX-M-9	PCR
<i>E. coli</i> J62 TEM-1	pI 5,4	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J62 TEM-2	pI 5,6	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 TEM-3	pI 6,3	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 TEM-9	pI 5,59	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 TEM-10	pI 5,6	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 SHV-1	pI 7,6	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 SHV-2	pI 7,6	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 SHV-4	pI 7,8	Determinação do Ponto Isoelétrico
<i>E. coli</i> J53 SHV-5	pI 8,2	Determinação do Ponto Isoelétrico

3.3. Armazenamento das bactérias

As linhagens estudadas fazem parte da bacterioteca do LEBEM e são mantidas a -80°C em caldo BHI, do inglês *Brain Heart Infusion* (Difco, Estados Unidos), acrescido de 15% de glicerol.

Para reativação do metabolismo bacteriano, confirmação da pureza e viabilidade das colônias, alíquotas das culturas estocadas foram cultivadas novamente em caldo BHI, incubadas a 37°C durante 18 – 24 horas e, em seguida, semeadas em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) suplementado com sangue de carneiro a 5% (ágar sangue), antes de serem submetidas aos experimentos.

3.4. Extração de DNA genômico bacteriano

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o método de Pitcher, Sanders e Owen (1989). As linhagens foram inicialmente semeadas em ágar sangue e incubadas durante 24 horas a 37°C. Colônias isoladas de cada linhagem foram transferidas para tubos tipo “eppendorf” contendo 100 µL da solução I: solução tamponante TE (10mM Tris e 1mM EDTA; pH 8,0) e 25% de sacarose. Foram adicionados a cada tubo 500µL do reagente GES (5M tiocianato de guanidina, 0,1M de EDTA e 0,5% da solução sarcosil a 30%).

Após a lise das células, foram adicionados aos tubos 250 µL de acetato de amônio (7,5M), misturados gentilmente e incubados em gelo por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados aos tubos 500 µL da solução de 4% de 2-pentanol em clorofórmio. Os tubos foram agitados por 10 minutos e, posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Alemanha). Foram transferidos 700 µL da fase orgânica (fase superior) da mistura para novos tubos “eppendorf” de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 875µL de etanol absoluto gelado (-20°C). Depois de homogeneizados, cada tubo foi mantido à temperatura de -20°C por 18 a 20 horas.

Após este período, os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi lavado com uma solução de acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto, repetindo as etapas de homogeneização e centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foi repetida a lavagem apenas com etanol absoluto. Após o descarte do sobrenadante e a evaporação de todo o etanol, foram adicionados 100µL da solução tamponante TE (10mM Tris e 1mM EDTA, pH 8,0) ao DNA precipitado para dissolvê-lo.

3.5. Amplificação de fragmentos de DNA

Os genes *bla*_{CTX-M} presentes nas linhagens foram detectados por reação em cadeia da polimerase, PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), utilizando as seqüências iniciadoras (do inglês, *primers*) específicos. Os *primers* MA1 e MA2 são degenerados, capazes de alinhar e amplificar fragmentos internos de 544pb específicos de genes *bla*_{CTX-M} que codificam enzimas dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9. Para determinar qual grupo pertence o gene *bla*_{CTX-M}, foram utilizados pares de *primers* específicos de cada grupo: M1r e M1f, M2f e M2r, M9f e M9r. A presença de genes dos grupos CTX-M-8 e CTX-M-25 nas linhagens foi investigada por PCR, utilizando os *primers* M8f e M8r, que são capazes de amplificar um fragmento de 581pb (Tabela 2 e Figura 5-A).

Ainda por PCR, foi definido se o gene *bla*_{CTX-M} está associado a integron ou a um segmento de inserção usando *primers* específicos na reação. Vários estudos mostram a presença da seqüência de inserção *ISEcp1* associada a genes *bla*_{CTX-M} (CAO et al., 2002; KARIM et al., 2001; LARTIGUE; POIREL; NORDMANN, 2004; MUNDAY et al., 2004; SALADIN et al., 2002). Portanto, a presença desta seqüência de inserção foi pesquisada utilizando o par de *primers* *ISEcp1f* e MA3r. O produto de amplificação desta reação pode apresentar diversos tamanhos, pois a região entre a *ISEcp1* e o gene *bla*_{CTX-M} é uma região de tamanho variável (Tabela 2 e Figura 5-B).

Para os casos em que o gene *bla*_{CTX-M} está associado a um integron, o *primer* ORF513f (localizado na região *ISCR1* dos integrons de classe 1) e o *primer* MA3r (*primer* consenso para todos os grupos de CTX-M) foram utilizados para amplificar o fragmento de tamanho variável entre esses dois elementos (Figura 5-C). A região onde os cassetes gênicos estão inseridos no integron foi amplificada por PCR, utilizando os *primers* 5'CSf e 3'CSr. O tamanho desta região depende do número de cassetes gênicos contidos nela. Como os cassetes

gênicos conferem resistência a diversas classes de antibióticos, o tamanho da sequência amplificada pode estar relacionado ao perfil de resistência da bactéria (Figura 5-C).

Tabela 2 - Pares de *primers* utilizados no estudo

<i>Primers</i>	Sequência (5'–3')	Fragmento amplificado	Tamanho (pb)	Temperatura de Anelamento	Referência
MA1 MA2	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	grupo <i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} e <i>bla</i> _{CTX-M-9}	544	57°C	Saladin et al., 2002
M1f M1r	GACGATGTCACTGGCTGAGC AGCCGCCGACGCTAATACA	grupo <i>bla</i> _{CTX-M-1}	499	53°C	Pitout et al., 2004
M2f M2r	ATGATGACTCAGAGCATTCTG TGGGTACGATTTTCGCCGC	grupo <i>bla</i> _{CTX-M-2}	866	55°C	Saladin et al., 2002
M9f M9r	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	<i>bla</i> _{Toho-2} e grupo <i>bla</i> _{CTX-M-9}	870	55°C	Saladin et al., 2002
M8f M8r	CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG ACCCACGATGTGGGTAGCCC	grupo <i>bla</i> _{CTX-M-8} e <i>bla</i> _{CTX-M-25}	581	51°C	próprio estudo
5' CSf 3' CSr	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	genes cassetes	variável	50°C	Lévesque et al., 1995
ORF513f MA3r	CTTTTGCCCTAGCTGCGG ACYTTACTGGTRCTGCACAT	Orf513 adjacente ao <i>bla</i> _{CTX-M}	variável	53°C	Lartigue et al., 2004 Saladin et al., 2002
ISEcp1f MA3r	AAAAATGATTGAAAGGTGGT ACYTTACTGGTRCTGCACAT	ISEcp1 adjacente ao <i>bla</i> _{CTX-M}	variável	49°C	Saladin et al., 2002

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

A.

B.

C.

Figura 5. Representação esquemática das reações de amplificação de fragmentos de DNA por PCR. A: *Primers* utilizados para detecção e identificação dos grupos dos genes *bla*_{CTX-M}; B: *Primers* utilizado para verificar a associação do gene *bla*_{CTX-M} com a *ISEcp1*; C: I utilizado para verificar a associação do gene *bla*_{CTX-M} com integrons de classe 1 contendo *ISCR1* e para pesquisar a região de cassetes gênicos. Os *primers* utilizados estão representados por setas, e os tamanhos dos fragmentos esperados após amplificação estão demonstrados.

3.5.1. Condições para a reação de amplificação

A PCR foi realizada utilizando os seguintes componentes para o volume de reação de 50 μL :

Componentes	Volume	Concentração final
Produto da extração de DNA (30 ng/ μl)	2 μL	60 ng
Tampão para PCR de Alta Fidelidade (10X) ^a	5 μL	1X
Mistura dos 4 nucleotídeos – dNTP (2,5 mM) ^b	4 μL	0,2 mM
<i>Primer</i> 1 (16 pmol/ μl)	1,5 μL	24 pmol
<i>Primer</i> 2 (16 pmol/ μl)	1,5 μL	24 pmol
MgSO ₄ (50 mM) ^a	2,0 μL	2 mM
Taq-DNA Polimerase (5 U/ μL) ^a	0,2 μL	1,0 U
Água duplamente processada “Qualidade PCR” ^c	q.s.p. 50 μl	_____

^a Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen – Life Technologies, Brasil)

^b dNTP Set (Eppendorf, Alemanha)

^c W-3500 (Sigma, EUA)

O DNA foi inicialmente desnaturado por aquecimento a 95°C por 5 minutos. Em seguida o material foi submetido a 30 ciclos térmicos das etapas de desnaturação, anelamento e extensão, nas seguintes condições:

- Desnaturação - 1 minuto a 95°C;
- Anelamento - 1 minuto à temperatura de anelamento de cada par de *primer*;
- Extensão - 1 minuto a 72°C.

Após os 30 ciclos foi procedida uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C.

As etapas de amplificação utilizadas em todas as reações tiveram as mesmas condições, com exceção da temperatura de anelamento. Os pares de *primers* utilizados, assim como as temperaturas específicas de anelamento, estão descritos na Tabela 2.

O termociclador utilizado para os experimentos foi o *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha).

3.5.2. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. A estes produtos, foram adicionados 10 µL de solução de azul de bromofenol (33% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol em tampão TBE 0,5X) e aplicados no gel de agarose.

O marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas Life Sciences) foi aplicado no gel de agarose para a determinação do tamanho dos fragmentos obtidos. A eletroforese foi realizada a 90 volts, utilizando fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech, Suécia) durante 120 minutos.

O gel, depois de corado com brometo de etídeo (1 µg/mL) por 15 minutos e descorado em água por 10 minutos, foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech, EUA).

3.6. Seqüenciamento

Os fragmentos obtidos por reação de amplificação foram seqüenciados para determinar a seqüência de cada gene *bla*_{CTX-M} e de sua localização genética, além de verificar possíveis mutações nos genes estudados.

Os produtos amplificados foram purificados com o *kit* de purificação GFX-TM PCR (Amersham Bioscience, Suécia) para estocagem e posterior seqüenciamento.

Todas as etapas do seqüenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para a etapa de amplificação, foram utilizados 1,0 µL de DNA (30 ng /µL), 0,8 µL do *primer* (16 pmol/µL), 4,0 µL da solução de GT Dye Terminator (*kit* DYEnamicTM ET Dye Terminator, Amersham Bioscience, Suécia) e água W-3500 (Sigma, Estados Unidos) suficiente para completar o volume final de 10,5 µL. A seguir, o ciclo de amplificação utilizado foi: 20 segundos a 95°C (desnaturação), 15 segundos a 50°C (pareamento) e 1 minutos e 20 segundos a 60°C (extensão), que foi repetido 30 vezes.

Em seguida o produto amplificado foi precipitado com acetato de amônio 7,5M e etanol 95% e então seqüenciado no MegaBACETM (Amersham Bioscience, Suécia). As seqüências obtidas foram analisadas no programa ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

3.7. Determinação do ponto isoeletrico

Os pontos isoeletricos (pI) das β-lactamases produzidas pelas linhagens que apresentam genes *bla*_{CTX-M} foram determinados por focalização isoeletrica em gel de

poliacrilamida. Esta metodologia foi utilizada para confirmar a produção e estimar o número de β -lactamases produzidas pela bactéria.

Após subcultivos em BHI, as bactérias foram condicionadas a choque térmico para a obtenção do extrato enzimático bruto. O extrato de cada bactéria foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (Ampholine pH 3,5-9,5, Amershan Biosciences, Suécia), usando o aparelho Multiphor II (Amershan Biosciences, Suécia). Esse gel apresenta um gradiente de pH em toda sua extensão. As condições da corrida eletroforética foram: 1500 volts, 50 mA, 30 watts, à temperatura de 10°C, usando fonte EPS 3501 (Amershan Biosciences, Suécia), por 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado com nitrocefina 500 mM (Oxoid, Inglaterra), que revela as bandas de β -lactamase. De acordo com a distância percorrida por cada banda, em comparação com a distância percorrida pelos controles utilizados, foram calculados os pI das β -lactamases produzidas por cada linhagem (MATTHEW; HARRIS, 1976).

3.8. Conjugação

As linhagens que apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-2} foram submetidas à conjugação para a verificação da mobilidade e a melhor caracterização desse gene. A conjugação foi realizada em caldo BHI utilizando *E. coli* K12 C600, resistente à estreptomicina, como linhagem receptora. Aliquotas de 0,5 mL das culturas das linhagens doadora e receptora em fase logarítmica de crescimento foram misturadas e adicionadas a 4 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C sem agitação. Os transconjugantes foram selecionados em ágar MacConkey contendo estreptomicina (300 µg/mL, Sigma, Estados Unidos) e cefotaxima (2 µg/mL, Aventis Pharma, Brasil). O meio MacConkey é útil para a indicação da fermentação da lactose, pois a linhagem receptora *E. coli* K12 C600 não fermenta lactose enquanto todas as linhagens de

Klebsiella spp. estudadas são fermentadoras deste carboidrato. Esta característica pode ser utilizada como outro critério de seleção, além da resistência à estreptomicina e cefotaxima.

As linhagens que apresentam os genes *bla*_{CTX-M-9} foram submetidas à mesma técnica de conjugação, porém, a linhagem receptora utilizada foi *E. coli* J53 AzR, que apresenta resistência à azida sódica, e a seleção dos transconjugates foi realizada em meio MacConkey acrescido de azida sódica (Mallinckrodt, Inglaterra) e cefotaxima (2 µg/mL, Aventis Pharma, Brasil).

3.9. Análise do perfil plasmideal

Após a seleção dos transconjugantes, foi realizada a análise do perfil plasmideal. Os plasmídeos foram extraídos das linhagens estudadas, dos transconjugantes e da linhagem receptora (*E. coli* K12 C600). As linhagens *E. coli* V517 (NCTC 50193) e *E. coli* 39R861 (NCTC 50192) foram utilizadas como controles por conterem plasmídeos de tamanhos definidos. A extração dos plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (TAKAHASHI; NAGANO, 1984).

Alíquota de 35 µL de cada extração foi aplicada em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 90V (EPS 200, Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), durante 5 horas. O gel foi então corado com brometo de etídio (1µg/mL) durante 20 minutos, observado e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech, EUA). Pela comparação da distância percorrida pelos plasmídeos da linhagem controle, foi estimado o tamanho dos plasmídeos obtidos nas demais linhagens.

3.10. Localização do gene *bla*_{CTX-M} no genoma bacteriano

3.10.1. Transferência de DNA plasmideal para membrana de náilon

Após a corrida eletroforética, o DNA plasmideal presente no gel foi transferido a vácuo (VacuGene Pump, Amersham Bioscience, Suécia) para membrana de náilon (Hybond-N⁺, Amersham Bioscience, Suécia).

Sobre uma membrana porosa (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) previamente umedecida com água purificada pelo sistema de quatro módulos foi colocada a membrana de náilon (cortada do tamanho do respectivo gel). Em seguida, uma máscara plástica (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) com uma abertura do tamanho do gel foi colocada sobre a membrana porosa. Por último o gel foi depositado sobre a abertura da máscara plástica. O poder de sucção do aparelho foi ajustado para 45-50mBar, durante toda a transferência.

A transferência do DNA plasmideal para a membrana de náilon foi iniciada adicionando-se solução fragmentadora (HCl 0,25M) sobre o gel, durante 4 minutos. O passo seguinte foi realizado pela adição de solução desnaturadora (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) por 3 minutos. O gel foi coberto com solução neutralizadora (1,5M NaCl; 0,5M Tris; 1mM EDTA; pH 7,2) durante 3 minutos. Entre cada uma destas etapas citadas anteriormente, foi realizada a secagem do gel com papel absorvente. Finalmente, o gel foi coberto com a solução de transferência (SSC 20X: NaCl 3M e citrato de sódio 0,3M) durante 45 minutos, em seguida, seco com papel absorvente. A posição do local de aplicação das amostras no gel foi marcada com lápis preto. A membrana foi deixada a 80°C durante 18 horas para a fixação e mantida em saco plástico para estudos posteriores envolvendo hibridação com sonda marcada com digoxigenina.

3.10.2. Preparo da sonda marcada com digoxigenina

As sondas de ácido nucléico que foram utilizadas nas reações de hibridação foram obtidas por PCR, utilizando como DNA molde as linhagens controle portadoras de gene *bla*_{CTX-M} *E. coli* RJ-15317 e *E. coli* RJ-24694 (Tabela 2). Os pares de *primers* utilizados foram M2f/ M2r e M9f/ M9r (Tabela 3), específicos para amplificar genes *bla*_{CTX-M} do grupo CTX-M-2 e CTX-M-9, respectivamente. As condições para a reação de amplificação foram as mesmas citadas no tópico 3.4.2.

O fragmento amplificado foi utilizado como molde em uma segunda reação de PCR, na qual foi incorporado nucleotídeos dUTP marcados com digoxigenina. As condições dessa segunda reação foram iguais às condições da primeira reação, com exceção do volume de dTTP, que foi reduzido e substituído por dig-11-dUTP 1mM (Roche, Alemanha), e do DNA molde, que será o produto amplificado da primeira reação.

3.10.3. Reação de hibridação

O DNA plasmideal extraído das linhagens estudadas, dos transconjugantes e da linhagem *E.coli* K12 C600, e transferido para a membrana de náilon foi submetido à reação de hibridação para confirmar a transferência do gene *bla*_{CTX-M} e para determinar qual plasmídeo que continha o gene hibridado.

Para a reação de hibridação de uma membrana de 100 cm² foram preparados 25 mL de solução de hibridação (SSC5X; 0,1% sarcosil; 0,2% SDS e 1% de reagente bloqueador). Esta solução foi colocada a 68°C por 1 hora para dissolução dos componentes. A membrana de náilon foi colocada em garrafas contendo 20mL de solução de hibridação. A garrafa foi fechada e incubada a 68°C por 1 hora ("Hybridization oven/shaker", Amersham Pharmacia

Biotech, Inglaterra). Após esta pré-hibridação, toda a solução foi removida e, em seguida, foi adicionada à garrafa a mistura de 12,5µL da sonda de DNA marcada com digoxigenina e 5mL de solução de hibridação. A sonda foi desnaturada a 95°C por 10 minutos antes do uso. A garrafa foi fechada e mantida a 68°C durante 18 horas.

A etapa seguinte foi a lavagem da membrana, que foi realizada duas vezes com 50 mL de solução SSC 2X/ 0,1% SDS, sob agitação à temperatura ambiente e, posteriormente, duas vezes com 50mL de solução SSC 0,1X/ 0,1% SDS (pré-aquecida a 68°C) por 15 minutos a 68°C.

Para a etapa de revelação dos híbridos a membrana foi lavada com 100 mL de tampão I (“Dig Wash and Block Buffer Set”, Roche, Alemanha) (100mM Tris; 150mM NaCl; pH 7,5) por 1 minuto. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 100mL de tampão II (1% reagente bloqueador em tampão de ácido maléico) por 30 minutos (solução desprezada após utilização). A membrana foi novamente lavada em 100mL de tampão I por 1 minuto. O próximo passo foi a adição de anticorpo anti-digoxigenina ligado à fosfatase alcalina (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments; Roche, Alemanha) diluído 1:5000 em solução bloqueadora, por 30 minutos. A membrana foi submetida a lavagens repetidas com 100mL de tampão I por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada nova lavagem com 20mL de tampão III (“Dig Wash and Block Buffer Set”, Roche, Alemanha) (100mM Tris; 100mM NaCl; 50mM MgCl₂; pH 9,5) por 3 minutos. A membrana foi transferida para uma garrafa de hibridação e foram adicionados 10mL de reagente de cor. O reagente de cor foi preparado adicionando-se 10mL de tampão III em 200µL de NBT/BCIP (“Dig High Prime DNA labeling and detection starter kit I”; Roche, Alemanha). A membrana foi mantida em contato com o reagente de cor, na ausência de luz, até o surgimento das bandas ou no máximo por 24 horas. Finalmente a membrana foi lavada com tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) e seca a 80°C por 3 minutos.

3.11. Eletroforese em campo pulsado

Foi analisado o perfil de macrorrestrição das linhagens de *Klebsiella* spp. estudadas, assim como dos transconjugantes e das linhagens receptora *E. coli* K12 C600 e *E. coli* J53 AzR com a enzima *Xba*I após eletroforese em campo pulsado (PFGE) com a finalidade de determinar o perfil clonal das linhagens de *Klebsiella* spp. estudadas e verificar a relação clonal entre as linhagens transconjugantes e receptora, confirmando a transferência do plasmídeo na reação de conjugação.

A PFGE foi realizada segundo Gauton (1997), usando fonte EPS600 e aparelho Gene Navigator (Pharmacia Biotech, Suécia). Uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37°C durante 24 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi adicionada em tubo “eppendorf” e centrifugada por 2 minutos, a 12000 rpm, a 4°C. As células bacterianas foram lavadas com 500µL da solução de suspensão (10mM Tris, 1,0M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 200µL de solução de suspensão, e 150µL foram transferidos para um novo tubo, colocados em banho de água a 48°C, por 5 a 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure, Gibco BRL, Espanha) para a confecção dos blocos de agarose.

Os blocos de agarose foram colocados em tubos contendo solução de lise (6mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% Na laurylsarcosine) acrescentando-se RNase a uma concentração final de 20 µg/mL; foram incubados por 4 a 5 horas a 37°C. Ao final deste período, a solução tamponante foi retirada, foi adicionada a solução tamponante ES (EDTA pH 9; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50°C por 18 a 20 horas. Os discos foram lavados 5 vezes com 13 mL da solução tamponante TE 1X

(10mM Tris, pH7,5; 1mM EDTA, pH 8,0), com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Os discos foram mantidos em solução tamponante TE a 4°C até o momento do uso.

Para a fragmentação do DNA, cada disco foi colocado em 100µL de solução tamponante 1X concentrada e mantido a 37°C por 30 minutos. Essa solução foi desprezada e uma nova solução, preparada no momento do uso, acrescida de 30 U da enzima de restrição *XbaI* foi adicionada. A reação foi incubada em banho de água a 37°C por 18 a 20 horas.

Para a corrida eletroforética, foram preparados 150 mL de gel de agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Gibco BRL, Espanha) em TBE 0,5X (0,89M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,25M EDTA; pH 8,0). A eletroforese foi realizada com solução de TBE 0,5X à temperatura de 14°C. Para as linhagens de *Klebsiella* spp. estudadas, a eletroforese foi realizada em voltagem de 180V por 25 horas. Os pulsos utilizados foram de 25 segundos durante 20 horas, 5 segundos durante 4 horas e de 0,5 segundo durante 1 hora. Para as linhagens de *E. coli* transconjugantes e receptoras, a voltagem foi 164V e a eletroforese teve duração de 22 horas, sendo que os pulsos seguiram por seis fases: 5 segundos durante 3 horas, 9 segundos durante 5 horas, 12 segundos durante 5 horas, 20 segundos durante 4 horas, 25 segundos durante 3 horas e 30 segundos durante 2 horas.

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo a 1 µg/mL por 30 minutos e descorados em água por mais 30 minutos. Em seguida, foram observados e fotografados usando o sistema de fotodocumentação AlphaImager® (Alpha Innotech, EUA).

Os perfis eletroforéticos de macrorrestrição foram analisados visualmente por comparação dos fragmentos de DNA de cada linhagem (doadora, receptora e transconjugante), considerando-se o número e o tamanho dos fragmentos, de acordo com Tenover e colaboradores (1995).

3.12. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A determinação da CIM (concentração inibitória mínima) das bactérias doadoras, receptoras e dos transconjugantes foi realizada pelo método de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do CLSI (2005), para os seguintes antibióticos: gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cefepime, cefoxitima, ceftazidima e cefotaxima.

As soluções dos antibióticos foram preparadas de acordo com as padronizações quanto aos solventes e diluentes específicos para cada antibiótico estabelecidas pelo CLSI (2005). Os cálculos de concentrações necessárias de cada antimicrobiano foram baseados na potência de cada droga. Foram feitas 13 diluições seriadas de cada antimicrobiano, iniciando em 250 µg/mL até 0,03125 µg/mL. A partir destas soluções, foram preparadas baterias de placas de ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) acrescidas das diluições seriadas de cada antibiótico.

O inóculo bacteriano a ser aplicado nos meios de cultura foi padronizado da seguinte forma: as amostras bacterianas com crescimento de 18 horas em ágar sangue foram suspensas em solução fisiológica esterilizadas em concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Com a utilização de aplicador de Steers, foram aplicados 2 µL da suspensão bacteriana em cada placa, iniciando-se pela placa com menor concentração da droga para a placa com maior concentração. As placas foram deixadas na câmara de fluxo laminar para secagem por 15 minutos e incubadas a 37°C por 24 horas.

A concentração inibitória mínima dos antibióticos foi determinada como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. O procedimento foi realizado em duplicata, utilizando-se controle do crescimento bacteriano (inoculação da bactéria em meio de cultura sem acréscimo de antibiótico) e controle da qualidade do experimento com a utilização da linhagem *E. coli* ATCC 25922.

4. RESULTADOS

4.1. Reação em cadeia da polimerase

De acordo com a reação de amplificação com *primers* consenso para os genes dos grupos CTX-M-1, 2 e 9 das 35 linhagens estudadas, foram observados fragmentos de tamanho correspondente a 544 pb em 17 linhagens (8 *K. oxytoca* e 9 *K. pneumoniae*) (Figura 5).

Figura 6. Gel de agarose 1% após eletroforese contendo os produtos amplificados por PCR das linhagens de *Klebsiella* spp., usando os *primers* MA1 e MA2. M: Marcador de DNA 100 pb GeneRuler™ (Fermentas, EUA)

Utilizando *primers* específicos, foi possível determinar o grupo CTX-M que cada gene *bla*_{CTX-M} detectado na reação anterior pertence. Os genes *bla*_{CTX-M} detectados nas linhagens *K. oxytoca* 01, 03, 26 e 163 são genes pertencentes ao grupo CTX-M-9 (Tabela 3). Os genes *bla*_{CTX-M} detectados nas linhagens *K. pneumoniae* 22, 24, 48, 90, 107, 151, 152, 175 e 180

pertencem ao grupo CTX-M-2 (Tabela 4). Não foram observados genes pertencentes ao grupo CTX-M-1. Não foi possível determinar os grupos dos genes detectados nas linhagens *K. oxytoca* 103, 181, 183 e 184 utilizando experimentos de PCR com os *primers* descritos neste estudo.

A presença de genes *bla*_{CTX-M} dos grupos CTX-M-8 e CTX-M-25 nas 35 linhagens estudadas também foi pesquisada por PCR utilizando os *primers* M8f e M8r (Tabela 2). Estes genes não foram encontrados em nenhuma linhagem.

Tabela 3 - Resultados da caracterização dos genes *bla*_{CTX-M} e PFGE obtidos nas linhagens de *K. oxytoca*

Linhagem	Data de isolamento	PFGE	pI			PCR		
						<i>bla</i> _{CTX-M} ^a	<i>ISEcp1</i> ^b	<i>ISCR1</i> ^c
Ko 01	02/01/00	H	5,2	7,8	8,4	CTX-M-9	400pb	ND
Ko 03	02/01/00	H	5,2	7,8		CTX-M-9	400pb	ND
Ko 26	02/02/00	H	5,2	7,8	8,4	CTX-M-9	400pb	ND
Ko 103	10/04/00	H1	5,2		8,4	Ind	700pb	ND
Ko 163	01/06/00	H2	5,2	7,8	8,4	CTX-M-9	400pb	ND
Ko 181	23/06/00	H1	5,2	5,6	8,4	Ind	700pb	ND
Ko 183	26/06/00	H	5,2	5,6	8,4	Ind	700pb	ND
Ko 184	27/06/00	H	5,2	5,6	8,4	Ind	700pb	ND

^a grupo de *bla*_{CTX-M} encontrado em cada linhagem; ^b gene *bla*_{CTX-M} associado à *ISEcp1*; ^c gene *bla*_{CTX-M} associado à *ISCR1*; Ko: *Klebsiella oxytoca*; ND: não detectado; Ind: apresentaram produtos amplificados na reação para detecção de genes *bla*_{CTX-M}, porém a identificação do grupo foi indefinida.

A presença do elemento gênico *ISEcp1*, associado ao gene *bla*_{CTX-M}, também foi investigada por PCR utilizando-se *primers* específicos. O tamanho dos fragmentos amplificados pode ser variável, pois depende do número de bases encontradas entre estes elementos. Os produtos amplificados nesta reação apresentaram, aproximadamente, 400 pb nas linhagens *K. oxytoca* 01, 03, 26 e 163; e de aproximadamente 700 pb nas linhagens *K. oxytoca* 103, 181, 183 e 184 (Tabela 3).

Pela reação de amplificação específica para a detecção do elemento *ISCR1* associado ao gene *bla*_{CTX-M}, foram verificados fragmentos amplificados de aproximadamente 1800 pb nas linhagens *K. pneumoniae* 22, 24, 48, 90, 107, 151, 152, 175 e 180 (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da caracterização dos genes *bla*_{CTX-M} e PFGE obtidos nas linhagens de *K. pneumoniae*

Linhagem	Data de isolamento	PFGE	pI					PCR		
								<i>bla</i> _{CTX-M} ^a	<i>ISEcp1</i> ^b	<i>ISCR1</i> ^c
Kp 22	31/01/00	A	5,2	7,2	7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 24	02/02/00	B	5,2	6,8		7,8	7,9 8,2	CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 48	28/02/00	C	5,2		7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 90	31/03/00	D	5,2		7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 107	10/04/00	A1	5,2	7,2	7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800pb
Ko 151	18/05/00	E	5,2		7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800 pb
Kp 152	19/05/00	F	5,2		7,6	7,9		CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 175	12/06/00	G	5,4		7,6	7,9	8,4	CTX-M-2	ND	1800pb
Kp 180	19/06/00	G	5,4		7,6	7,9	8,2	CTX-M-2	ND	1800pb

^a grupo de *bla*_{CTX-M} encontrado em cada linhagem; ^b gene *bla*_{CTX-M} associado à *ISEcp1*; ^c gene *bla*_{CTX-M} associado à *ISCR1*; ND: não detectado; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; As linhagens intimamente relacionadas ao clone A foram destacadas em vermelho. As linhagens intimamente relacionadas ao clone G foram destacadas em verde.

O elemento *ISCR1* é parte constitutiva de integrons de classe 1, portanto, para as linhagens *K. pneumoniae* foi realizada a pesquisa da região de cassetes gênicos por PCR. Todas as linhagens apresentaram um produto de amplificação de 720 pb, o que sugere que todas as linhagens possuem o mesmo integron.

4.2. Sequenciamento

Os genes *bla*_{CTX-M} pertencentes ao grupo CTX-M-2, encontrados nas linhagens *K. pneumoniae*, e pertencentes ao grupo CTX-M-9, nas linhagens *K. oxytoca* 01, 03, 26, 163, foram sequenciados, assim como as regiões à montante e à jusante desses genes.

Comparando os resultados do sequenciamento com as seqüências disponíveis no GenBank, as seqüências obtidas dos genes pertencentes ao grupo CTX-M-2 apresentaram 100% de identidade com o gene *bla*_{CTX-M-2}. De acordo com a determinação da seqüência à

montante do gene *bla*_{CTX-M-2}, foi identificado o elemento *ISCR1* localizado a 498 pb deste gene. A sequência de 266 pb imediatamente anterior ao gene *bla*_{CTX-M-2} demonstraram-se grande similaridade à sequência que antecede o gene *bla*_{KLUA-1}, gene este localizado no cromossomo da *Kluyvera ascorbata*. Os demais 232 pb, entre a *ISCR1* e esta sequência de 266 pb, consistem numa sequência comum aos elementos *ISCR-like* e que contem o sítio de recombinação utilizado pela transposase codificada pela *ISCR1* nos processos de mobilização gênica (Figura 7-A). Foram seqüenciados ainda 818 pb à jusante do gene *bla*_{CTX-M-2}, sendo que os últimos 376 pb representam a sequência parcial da *orf3*. Esse fragmento de 818 pb apresentou similaridade com a sequência posterior ao gene *bla*_{KLUA-1} (Figura 7-A).

Analisando os genes *bla*_{CTX-M} encontrados nas linhagens de *Klebsiella oxytoca*, os fragmentos dos genes pertencentes ao grupo CTX-M-9 foram seqüenciados e apresentaram 100% de identidade com o gene *bla*_{CTX-M-9}. Foram seqüenciados 144 pb localizados posteriormente e 628 pb anteriormente a este gene, nos quais parte do elemento *ISEcp1* foi identificada a 49 pb do códon de iniciação do gene *bla*_{CTX-M-9} (Figura 7-B). Tanto a sequência à montante, quanto à sequência à jusante do gene *bla*_{CTX-M-9} demonstrou similaridade com a sequência anterior e posterior ao gene cromossômico de *Kluyvera georgiana* *bla*_{KLUY-1}.

Os fragmentos amplificados na reação para a detecção de gene *bla*_{CTX-M}, utilizando *primers* consensos para os grupos CTX-M-1, 2 e 9, que não tiveram os seus grupos identificados (*K. oxytoca* 103, 181, 183, 184 – Tabela 3) foram seqüenciados usando os mesmos *primers* utilizados na PCR (MA1 e MA2). Apesar de estes *primers* serem degenerados, os resultados do seqüenciamento foram satisfatórios, e foram obtidas seqüências de boa qualidade. Todas as seqüências apresentaram similaridade com genes cromossômicos da família *bla*_{OXY}. Estes genes codificam β-lactamases intrínsecas de *K. oxytoca*.

Figura 7. Esquematização dos genes seqüenciados nas linhagens de *Klebsiella* spp. produtoras de CTX-M.

A: gene *bla*_{CTX-M-2} e seqüências adjacentes nas linhagens de *K. pneumoniae*; B: gene *bla*_{CTX-M-9} e seqüências adjacentes nas linhagens de *K. oxytoca*.

Os resultados referentes às reações de amplificação e seqüenciamento dos fragmentos de DNA estão demonstrados nos Apêndices A, B e C.

4.3. Determinação do ponto isoelétrico

Foram determinados os pontos isoelétricos das β -lactamases produzidas pelas 17 linhagens que apresentaram fragmentos amplificados na reação de detecção de genes *bla*_{CTX-M}.

Todas as linhagens de *K. oxytoca* se mostraram produtoras de β -lactamase apresentando pI sugestivos de enzimas da família TEM (pI 5,2 e 5,6); uma linhagem foi produtora de enzima de pI 7,6 compatível com β -lactamases da família SHV, OXA-19 ou CTX-M-8 e quatro linhagens foram produtoras de β -lactamase de pI 7,8 compatível com enzimas SHV ou CTX-M. Sete das oito linhagens apresentaram produção de β -lactamase de

pI 8,4. Este padrão de pI alcalino é indicativo, principalmente, de enzimas da família CTX-M (Tabela 3).

Foi constatada uma alta frequência de β -lactamases de pI alcalino entre as linhagens de *K. pneumoniae*. Todas as 9 linhagens se mostraram produtoras de enzimas com pI maiores ou iguais a 7,9 sugerindo enzimas da família CTX-M ou SHV. Foram também encontrados pontos isoelétricos (pI 5,2 e 5,4) que sugerem a produção de β -lactamases da família TEM por todas as linhagens de *K. pneumoniae*. Outro pI bastante comum nestas amostras foi o pI 7,6 sugestivo de enzimas da família SHV. Menos frequentemente foi demonstrado pI de 6,8 e 7,2, que são sugestivos de enzimas da família OXA (Tabela 4).

4.4. Conjugação

Após ensaios de conjugação em caldo, utilizando a linhagem *E. coli* K12 C600 resistente à estreptomicina como receptora, foram isoladas linhagens transconjugantes com resistência concomitante à estreptomicina e cefotaxima apenas das linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2. Ou seja, apenas as linhagens *K. pneumoniae* 22, 24, 48, 90, 107, 151, 152, 175, 180 apresentaram plasmídeos conjugativos que foram transferidos para a linhagem receptora *E. coli* K12 C600.

Para as linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 (*K. oxytoca* 1, 3, 26 e 163), foram obtidas linhagens transconjugantes apenas quando os ensaios de transferência foram realizados utilizando a linhagem *E. coli* J53 AzR, resistente à azida sódica, como linhagem receptora.

A transferência genética foi verificada pela detecção dos genes *bla*_{CTX-M} por PCR nas linhagens transconjugantes e pela comparação do perfil plasmideal das linhagens doadoras e

transconjugantes. Além disso, análises do perfil de digestão do DNA cromossômico das linhagens foram úteis para verificar a origem clonal das linhagens transconjugantes em relação à linhagem receptora.

As linhagens transconjugantes obtidas após a conjugação foram nomeadas com a designação da linhagem receptora utilizada no experimento seguida pelo número da linhagem doadora.

4.5. Análise do perfil plasmideal

Foi realizada a extração plasmideal das linhagens de *K. pneumoniae* que apresentaram gene *bla*_{CTX-M-2}, das linhagens de *K. oxytoca* que apresentaram *bla*_{CTX-M-9} e das respectivas linhagens transconjugantes. O tamanho desses plasmídeos foi estimado pela comparação da distância percorrida em eletroforese com as distâncias percorridas por plasmídeos de tamanhos conhecidos, extraídos de linhagens padrão. Os plasmídeos utilizados como padrão de tamanho molecular foram das linhagens *E. coli* V517 (NCTC 50193) e *E. coli* 39R861 (NCTC 50192).

De modo geral, as linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 apresentaram perfis plasmideais semelhantes. Todas elas apresentaram plasmídeos de tamanho estimado de 40 kb. Em alguns casos, é notada a presença de mais de uma banda de plasmídeo de tamanhos bastante próximos, que pode ser interpretado como sendo migrações de diferentes configurações de um único plasmídeo (Figura 8).

A comparação do perfil plasmideal das linhagens de *K. pneumoniae* doadoras e respectivas linhagens transconjugantes indicam que houve a transferência de material genético (Figura 9).

Figura 8. Perfil plasmideal das linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2, após eletroforese em gel de agarose 0,8%. A: *E. coli* RJ-15317 (controle do gene *bla*_{CTX-M-2}); B: *E. coli* 39R861 (linhagem padrão com tamanhos de plasmídeos conhecidos – em verde); C: *E. coli* V517 (linhagem padrão com tamanhos de plasmídeos conhecidos – em azul).

Figura 9. Perfil plasmideal das linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CX-M-2 e das respectivas linhagens transconjugantes, após eletrofores em gel de agarose 0,8%. *E. coli* K12 C600 – linhagem receptora; *E. coli* V517 e *E. coli* 39R861 – linhagens padrão para o tamanho dos plasmídeos.

Semelhantemente às linhagens de *K. pneumoniae*, as linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 apresentam perfil plasmideal homogêneo com a presença de três bandas de plasmídeos de tamanhos estimados diferentes: 35 Kb, 4,6 Kb e 2,5 Kb (Figura 10). A presença de bandas de migrações muito similares deve ser em razão de diferentes configurações de um mesmo plasmídeo.

Figura 10. Perfil plasmideal das linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9, após eletroforese em gel de agarose 0,8%. *E. coli* 39R861 e *E. coli* V517 – linhagem padrão com tamanhos de plasmídeos conhecidos.

Analisando a Figura 11, é possível comparar o perfil plasmideal das linhagens doadoras (*K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9) com o perfil plasmideal das linhagens transconjugantes. De acordo com essa comparação, apenas o plasmídeo de tamanho estimado

de 35 Kb se mostrou. Na Figura 11 pode ser visualizado mais de uma banda (além da banda referente ao DNA cromossômico) nas canaletas relativas às linhagens transconjugantes. Muito provavelmente essas bandas são migrações diferentes do mesmo plasmídeo, pois em repetições deste mesmo experimento foi visualizada apenas uma única banda (dados não mostrados). Além disso, a linhagem receptora *E. coli* J53 AzR só apresentou a banda referente ao DNA cromossômico (Figura 11).

Figura 11. Perfil plasmideal das linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 e das respectivas linhagens transconjugantes, após eletroforese em gel de agarose 0,8%. *E. coli* J53 AzR – linhagem receptora; *E. coli* V517 e *E. coli* 39R861 – linhagens padrão com tamanhos de plasmídeos conhecidos.

Apesar dos resultados obtidos, o protocolo utilizado não foi suficientemente eficiente para se obter uma extração de DNA plasmideal com rendimento satisfatório para futuros procedimentos como transferência de DNA para membrana de náilon e hibridação com sondas de DNA.

4.6. Reação de hibridação

Os produtos das extrações de plasmídeos obtidos em géis de agarose foram transferidos para membranas de náilon, as quais foram utilizadas em reações de hibridação com sondas genéticas relacionadas aos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9}.

Pelo fato da reação de hibridação não ser uma metodologia tão sensível quanto outras metodologias moleculares para detecção de genes, como a PCR, e os produtos da extração de DNA plasmideal realizados não terem apresentado muito material genético, os resultados obtidos com essa metodologia não foram muito conclusivos, apesar dos experimentos terem sido realizados mais de uma vez.

Foi visualizada reação de hibridação utilizando a membrana de náilon relativa ao gel de agarose contendo os produtos da extração de plasmídeos das *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 (Figura 8). Nesta ocasião, houve hibridação da sonda genética, construída com o gene *bla*_{CTX-M-2} da linhagem *E. coli* RJ-15317 (Tabela 1), nos pontos da membrana referentes à banda formada pelos plasmídeos de tamanho estimado de 40 Kb.

Para os demais géis de agarose contendo produtos de extração plasmideal, não foram observadas reação de hibridação.

4.7. Eletroforese em campo pulsado

Foram caracterizados os perfis de macrorrestrição do DNA genômico das bactérias após eletroforese em campo pulsado utilizando a enzima de restrição *Xba*I e, por comparação visual dos fragmentos de DNA considerando o número e o tamanho dos fragmentos, as linhagens foram tipadas de acordo com Tenover e colaboradores (1995).

Dentre as linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2, duas linhagens foram consideradas mesmo clone (*K. pneumoniae* 175 e 180, perfil G), duas outras foram consideradas estreitamente relacionadas entre si (*K. pneumoniae* 22 e 107, perfil A e A1, respectivamente), as outras 5 linhagens não apresentavam relação clonal umas com as outras (Figura 12).

De acordo com o perfil de macrorrestrição das linhagens de *K. oxytoca* estudadas, cinco linhagens apresentaram o perfil H, consideradas o mesmo clone (*K. oxytoca* 1, 3, 26, 183 e 184) e as outras três linhagens estreitamente relacionadas às essas (*K. oxytoca* 103 e 181, com o perfil H1; *K. oxytoca* 163, perfil H2). Esses resultados sugerem uma provável disseminação clonal de *K. oxytoca*, algumas delas produtoras de CTX-M-9 (*K. oxytoca* 1, 3, 26 e 163) (Figura 12).

Figura 12. Perfil de macrorrestrição do DNA genômico das linhagens de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de CTX-M após digestão com a enzima de restrição *Xba*I e PFGE. Os perfis clonais estão representados com letras (A a H) e os subtipos estão acrescidos de números, interpretados de acordo como proposto por Tenover e colaboradores (1995). M: Marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs).

Foram comparados os perfis de macrorrestrição das linhagens receptoras e transconjugantes obtidos nos experimentos de conjugação, com o objetivo de demonstrar a relação clonal das linhagens transconjugantes e as receptoras. Todas as linhagens transconjugantes obtidas após conjugação com linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 foram idênticas ou estreitamente relacionadas à linhagem receptora *E. coli* K12 C600. Assim como os perfis de macrorrestrição apresentados pelas linhagens transconjugantes obtidas após conjugação utilizando as linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 como doadoras, foram idênticos ao apresentado pela linhagem receptora *E. coli* J53 AzR.

4.8. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os valores da CIM de cada antibiótico testado para as linhagens receptoras (*E. coli* K12 C600 e *E. coli* J53 AzR), linhagens doadoras (*K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 e *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9) e para suas respectivas linhagens transconjugantes estão mostrados abaixo na Tabela 5. A interpretação dos valores de CIM obtidos foi baseada nas padronizações do CLSI (2005).

Todas as linhagens de *Klebsiella* spp. analisadas demonstraram fenótipo caracterizando altos níveis de resistência ao antibiótico cefotaxima (CIM > 256), que também está presente nas linhagens transconjugantes, provavelmente pela transferência dos plasmídeos contendo os genes *bla*_{CTX-M}. O fenótipo de resistência ao cefepime também esteve presente nas linhagens doadoras bem como nos respectivos transconjugantes (Tabela 5).

Apesar das linhagens de *K. oxytoca* não terem apresentado resistência *in vitro* à ceftazidima, os genes transferidos para as transconjugantes foram capazes de aumentar a CIM

deste antibiótico em até quatro diluições, porém perfil ainda interpretado como de sensibilidade a esta droga. As linhagens de *K. pneumoniae* 22, 24, 90, 107, 175 e 180 demonstraram resistência à ceftazidima, enquanto a linhagem *K. pneumoniae* 48 demonstrou sensibilidade e as linhagens *K. pneumoniae* 151 e 152 apresentaram resistência intermediária à ceftazidima. Independente da CIM apresentada pela linhagem de *K. pneumoniae*, todas as transconjugantes referentes a estas linhagens obtiveram um aumento da CIM de 1 para no máximo 8 µg/mL.

A maioria das linhagens de *Klebsiella* spp. apresentaram sensibilidade à cefoxitina, com exceção das *K. pneumoniae* 175 e 180, que, apesar de serem resistentes, não transferiram essa resistência para as transconjugantes.

Todas as linhagens de *K. oxytoca* e as *K. pneumoniae* 107, 175 e 180 foram resistentes ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, enquanto as linhagens *K. pneumoniae* 24 e 48 apresentaram resistência apenas ao ácido nalidíxico. No entanto, os fenótipos de resistência às quinolonas não foram transferidos para as linhagens transconjugantes.

A resistência ao aminoglicosídeo gentamicina foi detectado em todas as linhagens doadoras, inclusive, esses fenótipos de resistência foram transferidos para as linhagens transconjugantes, com exceção das linhagens *K. pneumoniae* 48 e 90 que não transferiram essa resistência.

Tabela 5. Resultados das CIM para as linhagens receptoras, doadoras e transconjugantes

Linhagem	CIM do antibiótico (µg/mL) ^a													
	CTX		CAZ		CPM		FOX		NAL		CIP		GEN	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
	^b ≤ 8	≥ 64	≤ 8	≥ 32	≤ 8	≥ 32	≤ 8	≥ 32	≤ 8	≥ 32	≤ 1	≥ 4	≤ 4	≥ 8
<i>E. coli</i> J53 AzR	0,125		0,5		0,125		4		4		< 0,031		0,5	
<i>K. oxytoca</i> 01	> 256		8		> 256		8		> 256		8		64	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 01	> 256		4		64		8		4		< 0,031		32	
<i>K. oxytoca</i> 03	> 256		8		> 256		8		> 256		8		64	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 03	> 256		4		64		8		4		< 0,031		32	
<i>K. oxytoca</i> 26	> 256		8		256		16		> 256		16		64	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 26	> 256		4		32		8		4		< 0,031		16	
<i>K. oxytoca</i> 163	> 256		8		256		8		> 256		8		32	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 163	> 256		8		64		8		4		< 0,031		16	
<i>E. coli</i> K12 C600	0,125		1		< 0,031		8		4		< 0,031		0,5	
<i>K. pneumoniae</i> 22	> 256		32		> 256		8		4		0,06		> 256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 22	> 256		8		128		8		4		< 0,031		32	
<i>K. pneumoniae</i> 24	> 256		64		> 256		16		> 256		0,5		256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 24	> 256		8		64		8		4		< 0,031		64	
<i>K. pneumoniae</i> 48	> 256		8		> 256		8		32		0,25		> 256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 48	> 256		8		128		8		4		< 0,031		1	
<i>K. pneumoniae</i> 90	> 256		32		64		8		4		0,06		256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 90	> 256		8		64		8		4		< 0,031		1	
<i>K. pneumoniae</i> 107	> 256		32		> 256		16		> 256		4		> 256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 107	> 256		8		128		8		4		< 0,031		16	
<i>K. pneumoniae</i> 151	> 256		16		256		4		4		0,06		> 256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 151	> 256		4		256		8		4		< 0,031		32	
<i>K. pneumoniae</i> 152	> 256		16		64		4		4		0,06		256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 152	> 256		4		256		8		4		< 0,031		16	
<i>K. pneumoniae</i> 175	> 256		64		256		32		> 256		8		256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 175	> 256		8		16		8		4		< 0,031		128	
<i>K. pneumoniae</i> 180	> 256		64		256		32		> 256		4		256	
<i>E. coli</i> K12 C600 – 180	> 256		8		16		8		4		< 0,031		128	

^a CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CPM, cefepime; FOX, cefoxitina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; S, sensível; R, resistente.

^b Os valores das CIM foram interpretados de acordo com o CLSI (2005).

5. DISCUSSÃO

Infecções causadas por bactérias resistentes à antibioticoterapia têm sido cada vez mais frequentes, não só em âmbito hospitalar, mas também na comunidade, se tornando um grave problema para a saúde pública. Estratégias para o combate e prevenção destas enfermidades são alvos atuais de estudos e pesquisas, portanto, é imprescindível o entendimento dos mecanismos e da disseminação de resistência aos antibióticos.

Em enterobactérias, a produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Em muitos países, as β -lactamases CTX-M são as mais predominantes em enterobactérias (POTTUMARTHY et al., 2005; QUINTEROS et al., 2003). Atualmente, os genes *bla*_{CTX-M} são os genes de resistência que mais se disseminam entre as enterobactérias. Inicialmente estavam associadas com surtos regionais, porém, mais recentemente, têm sido detectadas por todo mundo tanto em linhagens isoladas de pacientes hospitalizados quanto da comunidade (BONNET, 2004; MINARINI et al., 2007b).

Enzimas da família CTX-M foram detectadas em 13 (37,1%) das 35 linhagens produtoras de ESBL estudadas, assim, como em outros estudos (BONNET et al., 2000a; BONNET et al., 2000b; BONNET et al., 2001; BONNET, 2004), os resultados deste trabalho fortalecem a hipótese de alta incidência de enzimas CTX-M entre as β -lactamases produzidas por espécies de enterobactérias isoladas no Brasil.

Em estudo prévio com as mesmas linhagens utilizadas neste trabalho, a incidência de bactérias produtora de ESBL da família TEM atingiu 90% (MINARINI et al., 2007a), contrariando alguns estudos que relatam a predominância das enzimas CTX-M no Brasil (SADER et al., 2001).

Segundo Quinteros e colaboradores (2003), enzimas da família CTX-M-2 são as mais frequentes ESBL detectadas em enterobactérias isoladas em Buenos Aires. Os genes *bla*_{CTX-M-2} detectados no presente estudo estão inseridos em integrons contendo o elemento *ISCR1* e podem apresentar a mesma origem dos genes disseminados no território argentino,

pois, a sequência parcial dos integrons detectados é idêntica àquela que foi descrita na Argentina (VALVERDE et al., 2006).

As sequências à montante e à jusante do gene *bla*_{CTX-M-2} apresentaram alta similaridade com a região encontrada anteriormente e posteriormente aos genes *bla*_{KLUA-1} (número de acesso no *GenBank*: AJ272538), localizados no cromossomo de *Kluyvera ascorbata*. Este fato reforça a hipótese de que este gene é o ancestral dos genes *bla*_{CTX-M} pertencentes ao grupo CTX-M-2.

Os genes *bla*_{CTX-M-9} detectados em linhagens de *K. oxytoca* foram encontrados associados à sequência de inserção *ISEcp1* de forma similar ao descrito na França por Saladin e colaboradores (2002). A sequência entre os genes *bla*_{CTX-M-9} e *ISEcp1* demonstrou grande similaridade com a sequência que antecede o gene *bla*_{KLUY-1}, o gene progenitor das enzimas do grupo CTX-M-9. Além disso, esta sequência foi também observada anteriormente a outros genes *bla*_{CTX-M} que pertencem ao grupo CTX-M-9, como o gene *bla*_{CTX-M-14}. O fragmento entre os genes *bla*_{CTX-M-9} e *ISEcp1* descrito por Saladin e colaboradores (2002) apresentou 42 pb, enquanto o seqüenciado no presente estudo apresentou 49 pb. Esta variação do tamanho deste fragmento pode ser em função de diferentes processos de recombinação envolvendo a *ISEcp1* e o gene *bla*_{CTX-M-9}.

Quatro linhagens de *K. oxytoca* que apresentaram amplificação de um fragmento por PCR utilizando os *primers* MA1 e MA2 (Tabela 3), não apresentaram produtos amplificados por PCR com *primers* específicos para nenhum grupo CTX-M. Estas linhagens foram isoladas durante uma disseminação de *K. oxytoca* ocorrida no Hospital das Clínicas da FMRP-USP de janeiro a junho de 2000 juntamente com outras quatro linhagens que possuem sequências similares ao gene *bla*_{CTX-M-9}. Por se tratar de uma disseminação clonal, imaginava-se que essas quatro linhagens poderiam possuir o mesmo gene *bla*_{CTX-M-9} encontrado nas outras linhagens do surto e, por algum motivo como uma mutação ou inserção de algum elemento,

esses genes poderiam não ter sido amplificados. Porém, posteriormente, os produtos destas quatro linhagens amplificados por PCR com os *primers* MA1 e MA2 foram seqüenciados e apresentam identidade com genes cromossômicos *bla_{OXY}* de *K. oxytoca*. Os *primers* MA1 e MA2 foram analisados, usando o banco de dados *GenBank*, e foi constatado que eles podem alinhar perfeitamente com esses genes *bla_{OXY}* (com a exceção de uma base trocada em um dos *primers*) e amplificar um fragmento inespecífico de mesmo tamanho que o fragmento amplificado dos genes *bla_{CTX-M}* dos grupos CTX-M-1, 2 e 9. Portanto, a detecção dos genes *bla_{CTX-M}* por PCR utilizando os *primers* MA1 E MA2 podem apresentar resultados falso-positivos com genes *bla_{OXY}*.

Apesar de pouco precisa e específica, a focalização isoeletrica é uma metodologia útil para estimar o número de β -lactamases e a família das enzimas produzidas. Desta forma, os pontos isoeletricos encontrados foram analisados paralelamente aos resultados obtidos com as técnicas moleculares. Por este foco, os pontos isoeletricos encontrados foram coerentes com os resultados obtidos por PCR. Todas as linhagens que se mostraram portadoras de genes *bla_{CTX-M}* também se mostraram produtoras de enzimas com pI alcalino (acima de 7,8), sugestivo de enzimas da família CTX-M.

As linhagens que possuem gene *bla_{CTX-M-2}*, foram produtoras de enzimas com pI 7,9 (característico da enzima CTX-M-2) (Tabela 4). Um indício de que o gene está sendo expresso e, portanto, de que essas linhagens são produtoras da enzima CTX-M-2.

Das quatro linhagens que foram caracterizadas como portadoras de gene *bla_{CTX-M-9}*, três se mostraram produtoras de enzimas com pI sugestivo de CTX-M-9 (pI 8,4) (Tabela 3). O fato de não ter sido constatado pI sugestivo de CTX-M-9 em uma destas linhagens (*K. oxytoca* 03) pode ser devido à falta de precisão e a relativa complexidade do método de focalização isoeletrica que pode proporcionar resultados falso-negativos. Pode, ainda, ter

ocorrido um baixo nível de expressão do gene pela bactéria, havendo baixa produção desta enzima em níveis não detectáveis pela focalização isoeletrica.

Os experimentos de conjugação demonstraram que os genes *bla*_{CTX-M-2} das linhagens de *K. pneumoniae* estão localizados em elementos móveis que foram transferidos para a linhagem receptora *E. coli* K12 C600. Porém, para as linhagens de *K. oxytoca* que contém *bla*_{CTX-M-9}, linhagens transconjugantes foram obtidas apenas quando a linhagem receptora utilizada foi a *E. coli* J53 AzR. Para a confirmação dos estudos de transferência dos genes, foi realizado PCR a fim de detectar os genes *bla*_{CTX-M} nas linhagens transconjugantes, análise do perfil plasmideal das linhagens receptora, doadora e transconjugante com posterior hibridação com sondas específicas para os genes *bla*_{CTX-M}, e análise do perfil de macrorrestrrição após PFGE das linhagens receptora e transconjugante.

Os genes *bla*_{CTX-M} detectados nas linhagens doadoras (*K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 e *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9) também foram detectados nas linhagens transconjugantes por PCR. Além disso, pela análise dos perfis plasmideais, as linhagens transconjugantes adquiriram plasmídeos, após a conjugação, de mesmo tamanho que plasmídeos das linhagens doadoras. Os plasmídeos doados pelas linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 tinham tamanho estimado de 40 kb, enquanto os plasmídeos doados pelas linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 possuíam tamanho estimado de 35 kb. Algumas vezes, foram visualizadas mais de uma banda de plasmídeos com tamanhos próximos. Porém, não se pode afirmar que as bandas representam plasmídeos de tamanhos diferentes ou se representam as variações na mobilidade eletroforética das diferentes configurações de um único plasmídeo (super-espiralado, circular relaxada e linear). Os plasmídeos relatados na literatura que carregam genes *bla*_{CTX-M} variam de 60 kb a mais de 150 kb (KARIM et al., 2001; SALADIN et al., 2002).

O estudo dos perfis de macrorrestrição após PFGE foi útil para validar os experimentos de transferência genética por conjugação, certificando que as linhagens transconjugantes obtidas foram clonalmente relacionadas às linhagens receptoras e não às linhagens doadoras.

A dificuldade de extrair plasmídeos grandes, os quais apresentam baixos números de cópias, com qualidade suficiente para prosseguir as etapas subseqüentes, como transferência para membrana de náilon e hibridação com sonda de DNA, foi um problema para complementar a análise da transferência destes genes de resistência. Foi visualizada reação de hibridação com sonda para o gene *bla*_{CTX-M-2} apenas nas bandas referentes aos plasmídeos de 40 Kb das linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2. Porém, os resultados obtidos pela PCR, pela análise de plasmídeos e pela análise dos perfis de macrorrestrição são suficientes para concluir e confirmar os experimentos de transferência genética.

Ainda analisando os resultados obtidos por PFGE, as linhagens de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-2 demonstraram pertencer a diversos clones, com exceção das linhagens *K. pneumoniae* 22 e 107 e *K. pneumoniae* 175 e 180 que têm perfis de macrorrestrição semelhantes. Estes resultados, associados ao fato que todas essas linhagens apresentaram plasmídeos de mesmo tamanho, e ainda a presença do mesmo gene *bla*_{CTX-M} associado ao mesmo elemento gênico (*ISCR1*) em todas essas linhagens, sugerem que pode ter havido uma disseminação horizontal de plasmídeos entre diversos clones bacterianos. Essa promiscuidade entre espécies de enterobactérias transferindo um mesmo elemento gênico contendo genes *bla*_{CTX-M} já foi constatada em outros estudos (CANTÓN; COQUE; BAQUERO, 2003; CHANAWONG et al., 2002; MUGNAIOLI et al., 2006).

Por outro lado, as linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 apresentaram, após PFGE, perfis de macrorrestrição relacionados, caracterizando uma disseminação clonal. A relação de alguns genes *bla*_{CTX-M} com determinadas epidemias clonais também já foi relatada

em alguns trabalhos (BRADFORD et al., 1998; CANTÓN; COQUE; BAQUERO, 2003; PETRONI et al., 2002). Além disso, as outras quatro linhagens de *K. oxytoca* estudadas que não produzem enzimas CTX-M também pertencem ao mesmo clone que as linhagens *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9, sugerindo que ao longo da disseminação deste clone, houve fenômenos de perda e/ou ganho do plasmídeo contendo o gene *bla*_{CTX-M-9}.

A via pela qual as enzimas CTX-M se disseminam reportadas por diversos trabalhos (CANTÓN, COQUE, BAQUERO, 2003; MUGNAIOLI et al., 2006; PETRONI et al., 2002) e confirmada neste estudo podem ser um fator importante que justifica o caráter pandêmico deste tipo de resistência. O perfil epidemiológico deste mecanismo de resistência é resultado não apenas de disseminação de clones específicos, mas também de elementos genéticos móveis entre diversas espécies de enterobactérias.

Neste estudo, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos mais relacionados à resistência em bactérias produtoras de CTX-M (CANTÓN; COQUE, 2006) pelo método da difusão em ágar, para a determinação do perfil de resistência entre as linhagens estudadas.

Tanto as linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 quanto as linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 apresentaram níveis de resistência muito maiores contra cefotaxima do que contra ceftazidima. Este fenótipo é característico de bactérias que produzem a maioria das enzimas da família CTX-M (BONNET, 2004).

A presença do gene *bla*_{CTX-M-9} nas linhagens de *K. oxytoca*, utilizadas como linhagens doadoras, pode explicar os altos níveis de resistência à cefotaxima e ao cefepime, e resistência intermediária à ceftazidima apresentada por estas bactérias. O fato do mesmo fenótipo de resistência ter sido encontrado nas linhagens transconjugantes, sugere que o gene *bla*_{CTX-M-9} está localizado no plasmídeo de 35 Kb transferido por conjugação.

As linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 apresentaram altos níveis de resistência à cefotaxima, resistência ao cefepime e níveis de resistência menores (ou resistência intermediária para as linhagens de *K. pneumoniae* 48, 151 e 152) à cefazidima. De uma forma geral, esse perfil fenotípico também foi apresentado pelas linhagens transconjugantes, sugerindo que o gene *bla*_{CTX-M-2}, localizado no plasmídeo de 40 Kb, foi transferido por conjugação.

É bastante comum existência de outros mecanismos de resistência a antibióticos β -lactâmicos além da produção de enzimas ESBL. Nos últimos anos, estudos têm relatado linhagens que produzem concomitantemente enzimas ESBL e AmpC (COUDRON; HANSON; CLIMO, 2003). As enzimas AmpC são β -lactamases, codificadas por genes plasmídeos em espécies de *klebsiella*, capazes de hidrolisar cefalosporinas de até quarta geração e, ao contrário das ESBL, apresentam atividade contra cefoxitina (cefamicinas). Portanto, a inclusão no estudo da cefoxitina entre os antibióticos testados na determinação da concentração inibitória mínima teve como intuito a triagem de linhagens produtoras de β -lactamases AmpC.

O fato das linhagens estudadas terem apresentado sensibilidade ou resistência intermediária à cefoxitina, com exceção das linhagens de *K. pneumoniae* 175 e 180, exclui a possibilidade da produção de enzimas AmpC. Apesar das linhagens de *K. pneumoniae* 175 e 180 terem apresentado resistência à cefoxitina, essas linhagens também não foram consideradas produtoras de AmpC, pois a resistência apresentada foi em níveis baixos e não foi verificada resistência à cefoxitina nas linhagens transconjugantes.

As linhagens de *K. oxytoca* produtoras de CTX-M-9 e as linhagens de *K. pneumoniae* 24, 48, 107, 175 e 180, produtoras de CTX-M-2, apresentaram resistência a antibióticos da classe das quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina). Os principais mecanismos de resistência a essa classe de antimicrobiano, em bacilos Gram-negativos, estão relacionadas a

mutações cromossômicas nos genes referentes à DNA-girase (alvo de ação das quinolonas), a mecanismos menos específicos como diminuição da permeabilidade da membrana celular devido à perda de porinas, ou a genes plasmídeos como *qnr* e *aac(6')-lb-cr*. No caso destas linhagens, tal fenótipo de resistência pode se devido, provavelmente, a mutações na DNA-girase, o qual é o mecanismo de resistência a quinolonas mais comum em enterobactérias. Algumas das linhagens estudadas apresentam resistência as duas quinolonas testadas, enquanto outras apresentam resistência apenas à quinolona de primeira geração (ácido nalidíxico). Isto ocorre de acordo com a quantidade de mutações cromossômicas na sequência alvo da DNA-girase; uma única mutação confere resistência apenas ao ácido nalidíxico, enquanto mutações adicionais aumentam o espectro da resistência para as quinolonas de 2ª geração em diante, como por exemplo, à ciprofloxacina.

Outro fato importante que se destacou no perfil de resistência das linhagens estudadas foi a resistência apresentada por todas as linhagens de *Klebsiella* ao aminoglicosídeo gentamicina. Esse fenótipo de resistência também foi constatado na grande maioria das linhagens transconjugantes, sugerindo que genes de resistência à gentamicina podem estar localizados nos mesmos plasmídeos conjugativos nos quais estão localizados os genes *bla_{CTX-M-2}* e *bla_{CTX-M-9}*.

Diferenças no nível de resistência transferida entre linhagens doadoras e transconjugantes, evidenciadas, por exemplo, na CIM de gentamicina entre as linhagens de *K. pneumoniae* 48, 90, 107, 158 e suas respectivas linhagens transconjugantes, pode ser devido à somatória de genes e/ou mecanismos de resistência da linhagem doadora.

A alta frequência de fenótipo de multirresistência entre as linhagens produtoras de enzimas CTX-M é resultado da coexistência em um mesmo plasmídeo de genes *bla_{CTX-M}* com genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos (CANTÓN; COQUE, 2006).

Essa coexistência é mais uma estratégia adaptativa que garante a manutenção do gene de resistência à pressão seletiva de antibióticos pertencentes a classes diferentes.

Muitos esforços têm sido desempenhados pela comunidade científica com o propósito de esclarecer os mecanismos da rápida disseminação das enzimas CTX-M por todo mundo. As razões deste cenário pandêmico em que se encontra este mecanismo de resistência ainda não estão completamente elucidadas. Acredita-se que isto é consequência não só do uso indiscriminado das cefalosporinas (em particular da cefotaxima), mas sim de uma série de eventos em que os genes *bla*_{CTX-M} estão envolvidos.

Os resultados obtidos neste estudo refletem essa diversidade de mecanismos e estratégias que os genes *bla*_{CTX-M} utilizam para favorecer a sua permanência e expansão entre o genoma das enterobactérias: i. diferentes processos de recombinação e mobilização do gene *bla*_{CTX-M} foram encontrados, mediados pelos elementos *ISEcp1* e *ISCR1*; ii. foram constatados perfis epidemiológicos relacionados tanto com disseminação de clones bacterianos específicos quanto com a disseminação horizontal de plasmídeos entre vários clones; iii. foi constatada relação dos genes *bla*_{CTX-M} com fenótipos de multirresistência, proporcionado pela coexistência de genes de resistência a outras classes de antibióticos.

Bactérias produtoras de ESBL, que até a década passada estavam associadas a surtos endêmicos, atualmente, com o surgimento das enzimas CTX-M, são freqüentemente isoladas de infecção adquirida tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade (CANTÓN; COQUE, 2006; MINARINI et al., 2007b). Além disso, as enzimas CTX-M têm sido encontradas em bactérias isoladas de animais domésticos, de rebanhos de cortes, de produtos alimentícios e da água de esgoto (ROMERO et al., 2005; PITOUT et al., 2005; KOJIMA et al., 2005; CARATTOLI et al., 2005). Esse aumento da incidência e aparecimento de fontes comunitárias deste tipo de resistência demonstra a urgência e a necessidade de entender os

meios de disseminação dos genes *bla*_{CTX-M}, com a finalidade de direcionar uma estratégia de vigilância específica para bactérias produtoras de ESBL.

No atual contexto, em que os esquemas terapêuticos contra infecções bacterianas estão cada vez mais limitados devido à rápida aquisição de resistência pelos microrganismos, apenas uma política de vigilância imediata e eficiente seria capaz de controlar a disseminação destas bactérias. Similarmente a diversas enfermidades, as infecções bacterianas deveriam ser tratadas com um maior enfoque preventivo e profilático do que curativo.

6. CONCLUSÕES

- Entre as linhagens de *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL isoladas no período de janeiro a junho de 2000, a incidência das enzimas CTX-M foi alta (37,6%), porém, ao contrário de relatos atuais, não superou a incidência de outras ESBL como as enzimas TEM.
- Apenas duas enzimas da família CTX-M, já relatadas em enterobactérias isoladas no Brasil, foram identificadas no presente estudo (CTX-M-2 e CTX-M-9), entre mais de 60 enzimas CTX-M relatadas mundialmente.
- A enzima CTX-M-2 foi encontrada apenas em *K. pneumoniae*, enquanto a enzima CTX-M-9 em *K. oxytoca*.
- Os genes *bla*_{CTX-M} encontrados apresentaram apenas mutações já relatadas.
- Os genes *bla*_{CTX-M-2} quanto os genes *bla*_{CTX-M-9} estão localizados em plasmídeos conjugativos e podem ser horizontalmente transferidos.
- Os genes *bla*_{CTX-M-2} detectados apresentaram-se associados ao elemento de mobilização gênica *ISCR1*, enquanto os genes *bla*_{CTX-M-9} detectados apresentaram-se associados à sequência de inserção *ISEcp1*.
- A resistência à gentamicina foi transferida juntamente com a resistência aos β -lactâmicos após os ensaios de conjugação, sugerindo que ambas as resistências podem ser mediadas pelo mesmo plasmídeo.

- As enzimas CTX-M-2 e CTX-M-9 possuem maior atividade hidrolítica sobre o antibiótico cefotaxima do que sobre a ceftazidima.
- A disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} estão relacionados tanto com a disseminação clonal de bactérias quanto com a transferência horizontal de plasmídios entre diferentes clones bacterianos.
- A reação de amplificação para a detecção de genes *bla*_{CTX-M} dos grupos CTX-M-1, 2 e 9 com os *primers* MA1 e MA2 pode apresentar resultados inespecíficos com genes *bla*_{OXY}, presentes no cromossomo de *K. oxytoca*.

7. REFERÊNCIAS*

* De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARDUINO, S.M.; ROY, P.H.; JACOBY, G.A.; ORMAN, B.E.; PINEIRO, S.A.; CENTRON, D. *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class I integron (In35) which includes Orf513. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2303-2306, 2002.

AYALA, J.A.D.C.; POWER, P.; MOLLERACH, M.; GUTKIND, G. Novel class I integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar infantis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2257-2261, 2002.

BARTHÉLÉMY, M.; PEDUZZI, J.; BERNARD, H.; TANCREDE, C.; LABIA, R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromossomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. **Biochimica et biophysica acta**, v.1122, p.15-22, 1992.

BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J.M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; RÖHNISCH, T.; SCHWEIGHART, S.; WILHELM, R. A new plasmidic cephotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v.20, p.18-163, 1992.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v.18, p.294-298, 1990.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS, J.M. Sequences of genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) e CTX-M-2 e relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.509-513, 1996a.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; AMANN, S.; AKALIN, E.; ANG, O.; BAL, C.; CASELLAS, M. Characterization of beta-lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended spectrum class A beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.616-620, 1996b.

BERNARD, H.; TANCREDE, C.; LIVRELLI, V.; MORAND, A.; BARTHÉLÉMY, M.; LABIA, R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.29, p.590-592, 1992.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1-14, 2004.

BONNET, R.; DUTOIR, C.; SAMPAIO, J.L.M.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2269-2275, 2001.

BONNET, R.; RECULE, C.; BARADUC, R.; CHANAL, C.; SIROT, D.; DE CHAMPS, C., SIROT, J. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.29-35, 2003.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.M.; CHANAL, C.; SIROT, D., DE CHAMPS, C.; VIALARD, J.L.; LABIA, R.; SIROT J. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.3061-3068, 2000a.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.M.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1936-1942, 2000b.

BRADFORD, P.A.; YANG, Y.; SAHM, D.; GROPE, I.; GARDOVSKA, D.; STORCH, G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1980-1984, 1998.

BUSH, K.; MACALINTAL, C.; RASMUSSEN, B.A.; LEE, V.J.; YANG, Y. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.851-858, 1993.

CANTÓN R.; COQUE, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.1-10, 2006.

CANTÓN, R.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, p.315-325, 2003.

CAO, V.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P. ColEI-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1212-1217, 2002.

CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; BATTISTI, A. Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.833-835, 2005

CHANAWONG, A.; M'ZALI, F.H.; HERITAGE, J.; XIONG, J.H.; HAWKEY, P.M. Three cefotaximases, CX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.630-637, 2002.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologias dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbicos. 9th ed. Doc M7-A6, v.23, n.2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana. 9th ed. Doc M100-S15, v.25, n.1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

COUDRON, P.E.; HANSON, N.D.; CLIMO, M.W. Occurrence of extended-spectrum and AmpC β -lactamase in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.772-777, 2003.

ECKERT, C.; GAUTIER, V.; ARLET, G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.14-23, 2006.

ECKERT, C.; GAUTIER, V.; SALADIN-ALLARD, M.; HIDRI, N. VERDET, C.; OULD-HOCINE, Z.; BARNAUD, G.; DELISLE, F.; ROSSIER, A.; LAMBERT, T.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1249-1255, 2003.

FIETT, J.; PALUCHA, A.; MIACZYNSKA, B.; STANKIEWICA, M.; PRZONDO-MORDARSKA, H.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1499-1505, 2000.

FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.272-288, 2004.

GAUTON, R.K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2448-2453, 1997.

GNIADKOWSKI, M.; SCHENEIDER, I.; PALUCHA, A.; JUNGWIRTH, R.; MIKIENWICZ, B.; BAUERNFEIND, A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.827-832, 1998.

GUIMARÃES, D.B. Rastreamento epidemiológico de *Klebsiella* spp. produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2003. 145p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- ISHII, T.; OHNO, A.; TAGUSCHI, H.; IMAJO, S.; ISHIGURO, M.; MATZUSAWA, H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.2269-2275, 1995.
- KARIM, A.; POIREL, L.; NAGARAJAN, S.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. **FEMS Microbiology Letters**, v.201, p.237-241, 2001.
- KOJIMA, A.; ISHII, Y.; ISHIHARA, K.; ESAKI, H.; ASAI, T.; ODA, C.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, K. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.3533-3537, 2005.
- LARTIGUE, M.F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.234, p.201-207, 2004.
- LÉVESQUE, C.; PICHÉ, L.; LAROSE, C.; ROY, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.185-191, 1995.
- MATTHEW, M.; HARRIS A.M. Identification of beta-lactamases by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy. **Journal of General Microbiology**, v.94, p.55-67, 1976.
- MINARINI, L.A.R.; CLÍMACO, E.C.; GUIMARÃES, D.B.; FERREIRA, J.C.; PALAZZO, I.C.V.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. in a university hospital in Brazil. **Current Microbiology**, 2007a. /no prelo/

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Prevalence of community-occurring Extended Spectrum β -Lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, 2007b. /no prelo/

MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, F.; LUCA, F.D.; BRIGANTE, G.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; STEFANI, S.; TONIOLO, A.; ROSSOLINI, G.M. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.2700-2706, 2006.

MUNDAY, C.J.; BOYD, D.A.; BRENWALD, N.; MILLER, M.; ANDREWS, J.M.; WISE, R.; MULVEY, M.R.; HAWKEY, P.M. Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum β -lactamases CTX-M-25 e CTX-M-26. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4829-4834, 2004.

OLIVER, A.; PÉREZ-DÍAZ, J.C.; COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.616-620, 2001.

OLSON, A.B.; SILVERMAN, M.; BOYD, D.A.; MCGEER, A.; WILLEY, B.M.; PONG-PORTER, V.; DANEMAN, N.; MULVEY, M.R. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guayana. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, V.49, p.2112-2115, 2005.

OPLUSTIL, C.P.; NUNES, R.; MENDES, C.; RESISTNET GROUP. Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. **The Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.8-12, 2001.

- PAI, H.; CHOI, E.H.; LEE, H.J.; HONG, Y.; JACOBY, G.A. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3747-3749, 2001.
- PETRONI, A.; CORSO, A.; MELANO, R.; CACACE, M.L.; BRU, A.M.; ROSSI, A.; GALAS, M. Plasmidic extended-spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1462-1468, 2002.
- PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.151-156, 1989.
- PITOUT, J.D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K.B.; POIREL, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.52-59, 2005.
- PITOUT, J.D.D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N.D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.5715-5721, 2004.
- POIREL, L.; LARTIQUE, M.F.; DECOUSSER, J.W.; NORDMANN, P. ISEcpI-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.447-450, 2005.
- POIREL, L.; NAAS, T.; THOMAS, I.L.; KARIM, A.; BINGEN, E.; NORDMANN, P. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.3355-3361, 2001.
- POTTUMARTHY S.; YU Y.; SADER H.S.; JONES R.N.; CHEN M. Susceptibility testing accuracy of a CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase organism-producing population of Enterobacteriaceae: intermethod analysis for 9 β -lactams. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v.53, p.131-141, 2005.

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M.M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.2864-2867, 2003.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.602-604, 2002.

RODRÍGUEZ, M.M.; POWER, P.; RADICE, M.; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GALLEN, M.; AYALA, J.A.; GUTKIND, G. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4895-4897, 2004.

ROMERO, L.; LÓPEZ, L.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; RAMÓN HERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.625-631, 2005.

SABATÉ, M.; TARRAGE, R.; NAVARRO, F.; MIRO, E.; VERGES, C.; BARBE, J.; PRATS, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing- β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1970-1973, 2000.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.200-214, 2001.

SADER, H.S.; SAMPAIO, J.L.M.; ZOCCOLI, C.; JONES, R.N. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three brazilian medical centers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, p.63-79, 1999.

SALADIN, M.; CAO, V.T.B.; LAMBERT, T.; DONAY, J.L.; HERRMANN, J.L.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELISLE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.161-168, 2002.

TAKAHASHI, S.; NAGANO, Y. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20, p.608-613, 1984.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; DOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

TOLEMAN, M.A.; BENNETT, P.M.; WALSH, T.R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, p.296-316, 2006.

TZOUVELEKIS, L.S.; TZELEPI, E.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS N.J. CTX-M-type β -lactamase: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.137-142, 2000.

VALVERDE, A.; CANTÓN, R.; GALÁN, J.C.; NORDMANN, P.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M. In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*_{CTX-M-2} an associated with a Tn21-like element. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.799-802, 2006.

- VILLEGAS, M.V.; CORREA, A.; PEREZ, F.; MIRANDA, M.C.; ZULUAGA, T.; QUINN, J.P. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.49, p.217-222, 2004.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamase. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.137-165, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A – Dados sobre reações de amplificação e sequenciamento de fragmentos de DNA.

Número da linhagem	Resultados das diversas reações de amplificações								Sequenciamento
	MA1/MA2 (consenso para os grupos CTX-M-1, 2 e 9)								
	grupo CTX-M-1	grupo CTX-M-2	grupo CTX-M-9	M8f/M8r (consenso para os grupos CTX-M-8 e 25)	ISEcpI	ISCR1	Cassetes de genes		
4	-	-	-	-	-				genes <i>bla</i> _{CTX-M}
22	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
23	-	-	-	-					
24	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
35	-	-	-	-					
45	-	-	-	-					
48	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
51	-	-	-	-					
52	-	-	-	-					
58	-	-	-	-					
60	-	-	-	-					
74	-	-	-	-					
79	-	-	-	-					
86	-	-	-	-					
90	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
107	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
110	-	-	-	-					
116	-	-	-	-					
117	-	-	-	-					
120	-	-	-	-					
127	-	-	-	-					
129	-	-	-	-					
133	-	-	-	-					
151	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
152	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
175	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
180	+	-	+	-	-	1800 pb	720 pb	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
1	+	-	-	+	400 pb	-		<i>bla</i> _{CTX-M-9}	
3	+	-	-	+	400 pb	-		<i>bla</i> _{CTX-M-9}	
26	+	-	-	+	400 pb	-		<i>bla</i> _{CTX-M-9}	
103	+	-	-	-	700 pb	-		<i>bla</i> _{oxy}	
163	+	-	-	+	400 pb	-		<i>bla</i> _{CTX-M-9}	
181	+	-	-	-	700 pb	-		<i>bla</i> _{oxy}	
183	+	-	-	-	700 pb	-		<i>bla</i> _{oxy}	
184	+	-	-	-	700 pb	-		<i>bla</i> _{oxy}	

K. pneumoniae

K. oxytoca

Apêndice B – Sequência do gene *bla_{CTX-M-9}* e das regiões adjacentes, encontrada nas linhagens *Klebsiella oxytoca* produtoras de CTX-M-9

```

1 GAATACGACT ACTTTTTCTT TGTAACAAAT ACTACCTTGC TTTCTGAAAA AGTAGTTATA
61 TACTATGAAA AGCGTGGTAA TGCTGAAAAC TATATCAAAG AAGCCAAATA CGACATGGCG
121 GTGGGTCATC TCTTGCTAAA GTCATTTTGG GCGAATGAAG CCGTGTTTCA AATGATGATG
181 CTTTCATATA ACCTATTTTT GTTGTTCAAG TTTGATTCCT TGGACTCTTC AGAATACAGA
241 CAGCAAATAA AGACCTTTTCG TTTGAAGTAT GTATTTCTTG CAGCAAAAAT AATCAAAACC
301 GCAAGATATG TAATCATGAA GTTGTCGGAA AACTATCCGT ACAAGGGAGT GTATGAAAAA
361 TGTCTGGTAT AATAAGAATA TCATCAATAA AATTGAGTGT TGCTCTGTGG ATAAC TTGCA
421 GAGTTTATTA AGTATCATTG CAGCAAAGAT GAAATCAATG ATTTATCAAA AATGATTGAA
481 AGGTGGTTGT AAATAATGTT ACAATGTGTG AGAAGCAGTC TAAATCTTTC GTGAAATAGT
541 GATTTTTGAA GCTAATAAAA AACACACGTG GAATTTAGGT TTTAATGAAT ACTGATGTAA
601 CACGGATTGA CCGTATTGGG AGTTTGAGAT GGTGACAAAG AGAGTGCAAC GGATGATGTT
661 CGCGGCGGCG GCGTGCAATC CGCTGCTGCT GGCAGCGCG CCGCTTTATG CGCAGACGAG
721 TGCGGTGCAG CAAAAGCTGG CGGCGCTGGA GAAAAGCAGC GGAGGGCGGC TGGGCGTCGC
781 GCTCATCGAT ACCGCAGATA ATACGCAGGT GCTTTATCGC GGTGATGAAC GCTTTCCAAT
841 GTGCAGTACC AGTAAAGTTA TGGCGGCCGC GGCAGTGTCT AAGCAGAGTG AAACGCAAAA
901 GCAGCTGCTT AATCAGCCTG TCGAGATCAA GCCTGCCGAT CTGGTTAACT ACAATCCGAT
961 TGCCGAAAAA CACGTCAACG GCACAATGAC GCTGGCAGAG CTGAGCGCGG CCGCGTTGCA
1021 GTACAGCGAC AATACCGCCA TGAACAAATT GATTGCCAG CTCGGTGGCC CGGGAGGCGT
1081 GACGGCTTTT GCGCGCGCA TCGGCGATGA GACGTTTCGT CTGGATCGCA CTGAACCTAC
1141 GCTGAATACC GCCATTCCCG GCGACCCGAG AGACACCACC ACGCCGCGGG CGATGGCACA
1201 GACGTTGCGT CAGCTTACGC TGGGTCATGC GCTGGGCGAA ACCAGCGGG CGCAGTTGGT
1261 GACGTGGCTC AAAGGCAATA CGACCGGCGC AGCCAGCATT CGGGCCGGCT TACCGACGTC
1321 GTGGACTGCA GGTGATAAGA CCGGCAGCGG CGACTACGGC ACCACCAATG ATATTGCGGT
1381 GATCTGGCCG CAGGGTCGTG CGCCGCTGGT TCTGGTGACC TATTTTACCC AGCCGCAACA
1441 GAACGCAGAG AGCCGCCGCG ATGTGCTGGC TTCAGCGGCG AGAATCATCG CCGAAGGGCT
1501 GTAACTCTCA ATAATGGGGC GCTACGGTGC CCCACTTTCT ATTTATATAT CCGTAAAAGC
1561 TTTTCTTGAT ATACATCTTC AGCTTTTTGT ATGATTATTA ATATCATCTT TTTCGATGGC
1621 CTTAAGACCT TTTTAAGTCA AAAGTATT

```

mpA (parcial) (1-372)

IS_{Ecp1} (parcial)

IRL
(563-579)

bla_{CTX-M-9} (629-1504)

Apêndice C – Sequência do gene *bla*_{CTX-M-2} e das regiões adjacentes, encontrada nas linhagens *Klebsiella oxytoca* produtoras de CTX-M-2

1 GCTGATAACA ACTCGTGAGG GCTATTGCGG GTTAAGCATT TAGCGATGTC TAGGGCCAGA
61 CTGGACGTCT GAACGCAAGC CGCTGATACT GTACATAACC ACAGTATCAG CGGAGGATAC
121 CCATGTCGCT GGCAAGGAAC GCCACGGCGA GTCAATCGCC CACTCAAACA AACGGTTACG
181 AACGCCACCA ACCCGACCAG ACGCTGCTCT ACCAGCTGGT TGAGCAGCAC TACCCAGCCT
241 TCAAAGCCTC ACTCGAAGCC CAAGGTCAAC ACCTGCCTCG CTACATCCAA CAAGAATTCA
301 ACGACCTCCT CCAATGTGGC CGTCTGGAGT ATGGTTTCAT GCGGGTTCGC TGCGAGGATT
361 GTCATCACGA GCGTCTGGTC GCCTTCAGCT GTAAACGACG CGGCTTTTGC CCTAGCTGCG
421 GTGCCCCGCG GATGGCCGAG AGTGCGGCGC TGCTGATAGA CGAAGTCTTC CCCAAGGAGC
481 CCATTCGCCA GTGGGTGCTC AGCTTTCCTT TCCAGCTACG CTTTTTGCTG GCTCGCCATC
541 CCCAGCTGAT GGGCCAGGTC TTGAGTATCG TCTATCGTAC ACTCTCAACT CATCTGATCA
601 AAAAAGCCGG TTACACCAAA GCCTCTGCAC AAACCTGGCTC AGTGACTCTT ATCCAACGCT
661 TTGGCTCCGC GCTAAATCTC AATGTCCACT ACCACATGCT GTTCTCTGAT GGTGTCTATG
721 CCGAAGATGA CTATGGCAAG CAACGCTTCC ATCGTGTCAA GGCACCCACT TACGATGAGC
781 TGAATACGCT CGCTCACACC CTCAGCCATC GCATCGCTCG CTGCATGGAA AAGCGTGGGA
841 TTTTGGAGCG TGATGCCGAG AATACGTGGT TGACACTGGA AGAGGGCGAA GACGATACGC
901 TGA CTCAATT ACATGGTGCT TCGGTTACGT ATCGCATTGC CGTCGGCCCC CAGCAAGGGC
961 GCAAAGTCTT CACCCTGCAA ACCTTGCCAG GCGGTGAGGA TAAAGCCGAC TCAAGCAGTC
1021 GAGTAGCCAA CCATGCTGGT TTCTCGCTAC ACGCCGGTGT GATGGCCGAA GCGCATCAGC
1081 GGGATAAGCT TGAGCGCTTG TGTCGCTACA TTAGTCGGCC AGCGGTTTCA GAAAAACGTC
1141 TGGCATTAAC CGCCAATGGG CAGGTGCGTT ACGAGCTCAA AACTCCGTAC CGCAATGGCA
1201 CCACCCATGT GATCTTCGAG CCGCTGGACT TCATCGCCAA ACTCGCTGCG TTGGTACCTA
1261 AGCCGCGAGT CAACCTCACA CGCTTCCACG GCGTCTTTGC ACCGAACAGC AAACACCGAG
1321 TTCAAGTAAC ACCCGCCAAG CGGGGCAAGA AGCCCGACAA ATCGGAAGGT CTCGATACTA
1381 ACTGGCGTGA CAAGAGTCCT GCAGAGCGCC ACCGCGCCAT GACCTGGATG CAACGCCTCA
1441 AGCGAGTCTT CAATATTGAT ATTGAAGTCT GCGAACACTG CGGCGGTCAC GTCAAAGTGA
1501 TTGCCAGCAT CGAAGATCCG AAGGTCATTG AGCAGATTCT CAAGCATCTG AAACAGAAAA
1561 CAGCCAAGGC GAATGCCGCC AAGCAGCGTG AGCTGCCACC AGAACGAGCG CCGCCACTGA
1621 CTCCCAGCCT GTTCGATCCA TCACAGAGTC GTCTCTTTGA CTGACGACCC CAAATCCAAC

ISCR/ (123-1664)

continua

continuação

1681 ACTGCTCAAC ACTGCCAACT TTTAAACGGG GCGGTGGGGC AGTTTGTATC TCTCGAGCTA
1741 TCAGGCTAGA GATTTTACCG CCAAATCGAA CCTTATTAGA GCGGTTTAGG CTGGACCGGC
1801 AGTTAAAAATT GGGGCTTGAG CGGTAAACGA GTGAGGGAAT TTCAGGTAAG ATACTTCGGA
1861 TGAGGAGCAA AAAGGTGGTT TATACTTCCT ATACCCCTCG CCCTTTAAAC CCTATTGATT
1921 TTATGGCTAA TTTTGCGACA GACGTCAAAA AATTTTGCCG TACCTGCGTA CCCCTCATCC
1981 TTTTTTCCGC TGCTGCAAAA TGTGCTGCTC CTTTCGTGAG CGATCTCTGA CTTTTGCTTT
2041 TTCGCCGCGA TGTAACATG GACCAGGCTC AATTGTGGAG ATATTGGCAG GTTTTGTTTT
2101 TACTTTTTGT TTTTCAATG TATACTTGAA GGCCGAGGGA TAATACTAAT AGAGGATTTT
2161 TAATGATGAC TCAGAGCATT CGCCGCTCAA TGTTAACGGT GATGGCGACG CTACCCCTGC
2221 TATTTAGCAG CGCAACGCTG CATGCGCAGG CGAACAGCGT GCAACAGCAG CTGGAAGCCC
2281 TGGAGAAAAG TTCGGGAGGT CGGCTTGCGG TTGCGCTGAT TAACACCGCC GATAATTTCG
2341 AGATTCTCTA CCGTGCCGAT GAACGTTTTG CGATGTGCAG TACCAGTAAG GTGATGGCGG
2401 CCGCGGCGGT GCTTAAACAG AGCGAGAGCG ATAAGCACCT GCTAAATCAG CGCGTTGAAA
2461 TCAAGAAGAG CGACCTGGTT AACTACAATC CCATTGCGGA GAAACACGTT AACGGCACGA
2521 TGACGCTGGC TGAGCTTGGC GCAGCGGCGC TGCAGTATAG CGACAATACT GCCATGAATA
2581 AGCTGATTGC CCATCTGGGT GGTCCCGATA AAGTGACGGC GTTTGCTCGC TCGTTGGGTG
2641 ATGAGACCTT CCGTCTGGAC AGAACCGAGC CCACGCTCAA TACCGCCATT CCAGGCGACC
2701 CGCGTGATAC CACCACGCCG CTCGCGATGG CGCAGACCCT GAAAAATCTG ACGCTGGGTA
2761 AAGCGCTGGC GGAAACTCAG CGGGCACAGT TGGTGACGTG GCTTAAGGGC AATACTACCG
2821 GTAGCGCGAG CATTCGGGCG GGTCTGCCGA AATCATGGGT AGTGGGCGAT AAAACCGGCA
2881 GCGGAGATTA TGGCACCACC AACGATATCG CGGTTATCTG GCCGAAAAC CACGCACCGC
2941 TGGTCTGGT GACCTACTTT ACCCAACCGG AGCAGAAGGC GGAAAGCCGT CGGGATATTC
3001 TGGCTGCGGC GGCGAAAATC GTAACCCACG GTTTCTGATG CAATAAATGG AGCGAGGTAT
3061 CGCTCCATTT ACGTTAAAAA TGTGCTCCTG AACTTCAGTC TTGTCTTGCA ACGAACCCCTC
3121 ATCTCTTTCT ATCATTCGCG TCTTTTTTCT GGACCAAATA TCTTAGCTTC AGGAAGGTAA
3181 TAGATAACAA TTTCTTATGT AAACATTTTT ATTTTAAATA AATGTTTAAG GCATTTAATT
3241 ATTAGGTTGT TTGTTTTTAT TGTAATTATC TGATTTACAC TTGCAGTATT CCTATTTTTT
3301 TACACTGGAA TAATTTTCGC CTTCCGTATC TCCTTTCTGT CTGCATGGTT GTTTTCTAAT
3361 GGTTTTTTAT GCTTTAAGAA TTTTATTTAT TTTTAATAGT TGAAC TAAGA GCCATCTTAA

continua

blaCTX-M-2 (2163-3038)

continuação

3421 AAGCTTATTG ACAATAAATT ACCTCAATGA AATTATTCTA ATATGGATAA GGAGGGGACA
3481 ATGAAGTCGC TCAATAATAA TTTTGCAAGA GTTACCTGTA TGAGCTGCCC TTCTCATTGT
3541 GAAGTTAAGC CAAATGCCTC TCTACGGGTT TCATTTTGTC AGGAATACTG TTTTGTACC
3601 TGGCCTGAAG CCAGTCGCTA TTTCTCACTC GGTATCATGG AGGGTCTCCT TAAACAGCAA
3661 TATCACTACC TGTATCTTGG GTGTGTTTTT GTTGATTCTCT CTATTAGCTA TCTGCGTTTT
3721 TTTACTGACA AAAAATGGTT GGACTATTTA TACGAAACAA AACTAAAGAT AGTTCTCGTT
3781 TGCGATAGGC ACCTCAGACC ATTGGCTAAT TACTGGTATA AGCATCACAA AGATATTTTT
3841 TTGATTATTT ATCAAC

orf3 (parcial) (3481-3856)

conclusão

Anexo A – Dados relativos às linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL – Isolamento e Caracterização fenotípica da produção de ESBL. (resultados obtidos em estudo prévio – CNPq processo nº 475482/01-8; GUIMARÃES, 2003)

Número da Amostra	Data do isolamento	Paciente	Espécime Clínico	Enfermaria ^a	Pesquisa de ESBL						
					ATB ^b	DDS ^c	Disco Combinado			E-test [®] ESBL	
							CAZ ^d	CTX ^e	CPD ^f	CAZ ^d	CTX ^e
4	04/01/00	AIPC	Urina	IMU	+	+	+	+	+	+	+
22	31/01/00	LA	Urina	PED	+	+	+	+	+	+	-
23	01/02/00	MCR	Urina	BER	+	+	+	+	-	+	-
24	02/02/00	ASJ	Urina	CIR	+	+	+	+	+	+	-
35	15/02/00	MRF	Urina	CTI	+	+	+	+	+	+	-
45	25/02/00	JRO	Cervical	CCP	+	+	+	+	-	+	+
48	28/02/00	HET	Urina	GAST	+	+	+	+	+	+	+
51	28/02/00	DAPS	Traqueal	BER	+	+	+	+	+	+	+
52	28/02/00	RnICCL	Traqueal	BER	+	+	+	+	+	+	+
58	02/03/00	GSL	Líquor	BER	+	+	+	+	+	+	+
60	09/03/00	DSF	Urina	PED	+	+	+	+	-	+	+
74	16/03/00	SM	Sangue	HEM	+	+	+	+	-	+	+
79	19/03/00	SM	Sangue	HEM	+	-	+	+	+	+	+
86	24/03/00	DFS	Cateter	BER	+	+	+	+	+	+	+
90	31/03/00	MJEJ	Urina	CM	+	+	+	+	+	+	+
107	03/05/00	LAG	Pele	CM	+	+	+	+	+	+	+
110	13/04/00	ESC	Pele	PED	+	-	+	+	+	+	+
116	19/04/00	KFR	Pele	PED	+	+	+	+	+	+	+
117	19/04/00	CEPJ	Cateter	BER	+	+	+	+	+	+	+
120	27/04/00	RnAMOS	Sangue	BER	+	+	+	+	+	+	+
127	03/05/00	RnMOJ	Pele	CM	+	+	+	+	+	+	+
129	04/05/00	RnODT	Pele	BER	+	+	+	+	+	+	+
133	08/05/00	DC	Urina	CIR	+	+	+	+	-	+	+
151	18/05/00	CPPS	Escarro	PED	+	+	+	+	+	+	+
152	19/05/00	JLS	Urina	MI	+	+	+	+	+	+	+
175	12/06/00	DGB	Abscesso	ORT	+	+	+	+	+	+	+
180	19/06/00	SGF	Ferida	ORT	+	+	+	+	+	+	+

^a ORT – ortopedia, HEM – hematologia, IMU – imunologia, GAST – gastroenterologia, PED – pediatria, CIR, cirurgia, BER – berçário, CM – clínica médica, CCP – cirurgia de cabeça e pescoço, MI – moléstias infecciosas; ^b triagem de produção de ESBL pelo antibiograma; ^c teste de aproximação; ^d CAZ – ceftazidima; ^e CTX – cefotaxima; ^f CPD – cefpodoxima.

Anexo B – Dados relativos às linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL – Isolamento e Caracterização fenotípica da produção de ESBL. (resultados obtidos em estudo prévio – CNPq processo nº 475482/01-8; GUIMARÃES, 2003)

Número da Amostra	Data do isolamento	Paciente	Espécime Clínico	Enfermária ^a	Pesquisa de ESBL					
					ATB ^b	DDS ^c	Disco Combinado			E-test [®] ESBL
							CAZ ^d	CTX ^e	CPD ^f	CAZ ^d CTX ^e
1	02/01/00	AMS	Urina	CIR	+	+	+	+	+	+
3	02/01/00	JMS	Ferida	ORT	+	+	+	+	+	+
26	02/02/00	ACA	Urina	CC	+	+	+	+	+	+
103	10/04/00	JAF	Sangue	TMO	+	+	+	+	+	+
163	01/06/00	MAS	Urina	UETDI	+	+	+	+	+	+
181	23/06/00	MLA	Ouvindo	ORT	+	+	+	+	+	+
183	26/06/00	WLR	Ferida	ORT	+	+	+	+	+	+
184	27/06/00	AMCB	Uretral	UTR	+	+	+	+	+	+

^a ORT – ortopedia, CIR, cirurgia, UTR – unidade de tratamento intensivo, CC – sala de curativos, UETDI – unidade especial de tratamento de doenças infecciosas, TMO – transplante de medula óssea, ^b triagem de produção de ESBL pelo antibiograma; ^c teste de aproximação; ^d CAZ – ceftazidima; ^e CTX – cefotaxima; ^f CPD – cefpodoxima.

Anexo C – Antibiograma das linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL.
(resultados obtidos em estudo prévio – CNPq processo nº 475482/01-8; GUIMARÃES, 2003)

Número da Amostra	Antimicrobiano (µg/mL) ^a															IMP	T/S
	AZ	AP	AMC	A/S	CF	CAZ	CTX	CPD	FOX	CRO	CXM	CIP	NOR	AM	GN	TO	
4	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	32	≤ 4	> 8	> 2/38
22	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	4	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	> 8	> 8	> 2/38
23	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	≤ 1	8	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
24	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	> 16	≤ 4	≤ 1	16	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	8	> 8	> 8	> 2/38
35	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	≤ 8	≤ 4	> 4	≤ 2	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	8	> 8	> 8	> 2/38
45	≤ 8	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	≤ 8	> 32	≤ 1	4	> 32	> 16	≤ 1	-	16	> 8	> 8	> 2/38
48	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	> 16	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8	> 8	> 2/38
51	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	4	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
52	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	8	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
58	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	4	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
60	≤ 8	> 16	≤ 8/4	-	> 16	> 16	≤ 4	≤ 1	> 16	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	> 8	> 8	> 2/38
74	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	≤ 1	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	32	≤ 4	> 8	> 2/38
79	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	≤ 4	> 8	> 2/38
86	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	> 8	> 8	> 2/38
90	≤ 8	> 128	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	≤ 4	> 4	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	> 8	> 8	> 2/38
107	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	8	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8	> 8	> 2/38
110	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	4	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
116	> 16	> 16	16/8	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	16	> 32	> 16	≤ 1	≤ 4	> 32	> 8	> 8	> 2/38
117	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	≤ 1	> 8	> 32	> 8	> 8	> 2/38
120	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	> 16	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
127	≤ 8	> 16	≤ 8/4	16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 2	> 32	> 16	≤ 1	-	≤ 2	> 8	2	≤ 2/38
129	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	4	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
133	≤ 8	> 16	≤ 8/4	-	> 16	> 16	≤ 4	≤ 1	≤ 2	> 32	> 16	> 2	≤ 4	> 32	≤ 1	> 8	> 2/38
151	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	8	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
152	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	16	> 32	> 4	> 16	> 32	> 16	≤ 1	-	> 32	> 8	> 8	> 2/38
175	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	16	> 32	> 16	> 2	> 8	16	> 8	> 8	≤ 2/38
180	> 16	> 16	16/8	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	16	> 32	> 16	> 2	> 8	16	> 8	> 8	> 2/38

^a AZ – aztreonam, AP – ampicilina, AMC – amoxicilina / ácido clavulânico, A/S – ampicilina / sulbactam, CF – cefalotina, CAZ – ceftazidima, CTX – cefotaxima, CPD – cefpodoxima, FOX – ceftioxima, CRO – ceftioxona, CXM – ciprofloxacina, NOR – norfloxacina, AM – ampicilina, GN – gentamicina, TO – tobramicina, IMP – imipenem, T/S – trimetoprim/sulfametoxazol; Verde – sensível; Amarelo – intermediário; Vermelho – resistente.

Anexo D – Antibiograma das linhagens de *K. oxytoca* produtoras de ESBL.
(resultados obtidos em estudo prévio – CNPq processo nº 475482/01-8; GUIMARÃES, 2003)

Número da Amostra	Antimicrobiano (µg/mL) ^a														
	AZ	AP	AMC	A/S	CF	CAZ	CTX	CPD	FOX	CRO	CXM	CIP	NOR	AM	GN
T/S															
	IMP	TO	IMP	TO	IMP	TO	IMP	TO	IMP	TO	IMP	TO	IMP	TO	IMP
1	≤ 8	> 16	16/8	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	> 16	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8
3	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	8	> 32	> 16	> 2	-	32	> 8
26	≤ 8	> 16	≤ 8/4	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	4	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8
103	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	≤ 4	> 4	16	> 32	> 16	> 2	-	> 32	> 8
163	≤ 8	> 16	≤ 8/4	-	> 16	> 16	≤ 4	> 4	4	> 32	> 16	> 2	> 8	16	> 8
181	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8
183	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8
184	> 16	> 16	≤ 8/4	> 16/8	> 16	> 16	> 32	> 4	≤ 8	> 32	> 16	> 2	> 8	> 32	> 8

^a AZ – aztreonam, AP – ampicilina, AMC – amoxicilina / ácido clavulânico, A/S – ampicilina / sulbactam, CF – cefalotina, CAZ – ceftazidima, CTX – cefotaxima, CPD – cefpodoxima, FOX – cefoxitina, CRO – ceftriaxona, CXM – ciprofloxacina, NOR – norfloxacina, AM – ampicilina, GN – gentamicina, TO – tobramicina, IMP – imipenem, T/S – trimetoprim/sulfametoxazol; Verde – sensível; Amarelo – intermediário; Vermelho – resistente.