

## RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA POR EXTEND SPECTRUM BETALACTAMASES (ESBLs) EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE COELHOS

### ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN "EXTEND SPECTRUM BETALACTAMASES"(ESBL) in *Escherichia coli* ISOLATED RABBIT IN SÃO PAULO, SP, BRAZIL

**Hanna Gabrielle Marcondes Jorgeb, Sarah Canovab, Antonio Fernando Pestana de Castroa**

aUniversidade de São Paulo. São Paulo, Brasil

bComplexo Educacional Faculdades Metropolitanas Unidas, Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde. São Paulo, Brasil.

#### RESUMO

Amostras de *Escherichia coli* com resistência ou variável susceptibilidade a cefalosporinas de terceira geração foram detectadas em humanos e animais em todo o mundo. Existe um grupo de *E. coli* produtora de enzimas do tipo CTX-M, que tem emergido como importante agente de infecções do trato urinário. Desta forma, este trabalho busca verificar *E. coli* isoladas de fezes de coelhos com e sem diarreia, além de comparar dados existentes na literatura sobre as ESBLs, verificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de amostras de coelhos que sejam ESBLs-positivas.

Notou-se ao longo do trabalho que, apesar de poucos registros, tanto quanto sabemos, computamos um número significativo de amostras carregando genes para CTX-M, SHV e TEM. Algo que também deve ser ressaltado é que embora raro, foram encontradas amostras que produziam CTX-M e SHV concomitantemente. Também foi constatada a co-produção de CTX-M e TEM em uma amostra.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, coelhos, ESBL, CTX-M

#### Abstract

*Escherichia coli* with variable resistance or susceptibility to third-generation cephalosporins have been detected in humans and animals throughout the world. There is a group *E. coli* produces enzymes CTX-M type, which has emerged as an important agent for urinary tract infections. Thus, this work aims to verify *E. coli* isolated from feces of rabbits with and without diarrhea and to compare existing data on ESBLs, check the profile of antimicrobial susceptibility of samples of rabbits that are ESBL-positive.

It was noted that throughout the work, though very few records as far as we know, we compute the number of samples significant carrying genes for CTX-M, TEM and SHV. Something that should also be emphasized is that although rare, were found samples that produced CTX-M and SHV concurrently. There was also a co-production of CTX-M and TEM in a sample.

Key words: *Escherichia coli*, rabbits, ESBL, CTX-M

## INTRODUÇÃO

A bactéria *E. coli* tem sido isolada com frequência de surtos de diarreia que acometem coelhos de criações de países europeus.<sup>1</sup> Esta patogenia afeta animais lactantes e principalmente desmamados, resultando em perda de peso e mortalidade que varia de 25% a 40%, atingindo em média 30% dos animais infectados.<sup>2</sup> Os microrganismos podem adquirir resistência aos fármacos através de várias maneiras: produção de enzimas, alteração da permeabilidade, desenvolvimento de um alvo estrutural alterado, ou desenvolvimento de uma via alternativa da reação inibida pelo fármaco.<sup>3</sup> Agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos têm sido os mais comumente utilizados para tratar infecções bacterianas.<sup>4</sup>

As ESBLs, apesar de serem amplamente detectadas em várias instituições médicas humanas, não são frequentemente relatadas na população bacteriana de animais, podendo significar que essas enzimas são menos prevalentes em animais ou não têm sido amplamente pesquisadas.<sup>5</sup>

As  $\beta$ -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas.<sup>6</sup> Os genes que codificam a produção dessas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. As  $\beta$ -lactamases de origem cromossômicas são de origem universal em algumas espécies bacterianas, enquanto que aquelas de origem plasmidial são variáveis, permitindo que esses elementos sejam transferidos entre espécies. A mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, os quais transportam os genes da  $\beta$ -lactamase desde os plasmídeos até os cromossomos. Essa mobilidade é importante, pois permite que os genes resistentes se disseminem através das diversas comunidades bacterianas.<sup>7</sup>

Diante destes dados, se justifica e se faz necessário a inclusão na presente pesquisa, de amostras de EPEC (*E.coli Enteropatogênicas*) isoladas de coelhos, já que a presença de ESBLs em amostras de EPEC foram constatadas em coelhos em Portugal.<sup>8</sup> Faz-se necessário também, analisarmos amostras de *E. coli* isoladas do trato intestinal de animais, com e sem diarreia,

visto que a presença de ESBLs em amostras de *E. coli* de origem animal tem sido raramente estudada, mesmo em outros países, sendo praticamente inexistente no Brasil em amostras de *E. coli* de origem animal.<sup>9</sup>

A família *Enterobacteriaceae* é a maior e mais heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos importantes na medicina, de tamanho moderado, móveis com flagelos peritríquios ou imóveis, e não formam esporos. Atualmente, no mínimo 27 gêneros e 7 grupos entéricos, com mais de 110 espécies foram descritos na literatura. Estes gêneros foram classificados com base na homologia do DNA, propriedades bioquímicas, reações sorológicas, suscetibilidades aos antibióticos.

Os *Enterobacteriaceae* são organismos ubíquos encontrados em todo o mundo no solo, água, vegetação, e são parte da flora microbiana normal de quase todos os animais, incluindo os seres humanos. Alguns membros da família (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*) estão sempre associados à doença quando isolados do homem, enquanto outros (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) são membros da flora comensal normal que podem causar infecções oportunistas. As infecções causadas pelos *Enterobacteriaceae* podem originar-se de um reservatório animal, de um portador humano, ou por disseminação endógena dos organismos em um paciente susceptível, e as infecções podem envolver praticamente todos os pontos corporais.

O gênero *Escherichia* consiste em no mínimo cinco espécies, sendo *Escherichia coli* a mais frequentemente isolada. A *E.coli* está presente no trato gastrointestinal em grandes números, e é a *Enterobacteriaceae* associada mais amiúde à sepse bacteriana.

As síndromes clínicas podem ser citadas como:

Septicemia: A *Escherichia coli* é o bacilo Gram-negativo mais comum isolado de pacientes sépticos. Em geral o foco da infecção é uma infecção das vias urinárias ou disseminação de organismos do trato gastrointestinal. A mortalidade associada à septicemia por *E.coli* é influenciada pela fonte de infecção e pela doença subjacente do paciente.

Infecções das vias urinárias. A *Escherichia coli* é responsável por mais de 80% de todas as infecções das vias urinárias adquiridas na comunidade e pela maioria das infecções hospitalares. As cepas infectantes originam-se no trato gastrointestinal, com doença associada a sorotipos específicos. A capacidade das bactérias resistirem à destruição no soro, produzirem hemolisinas e ligarem-se às células do epitélio urinário está associada ao aumento da virulência.

Meningite: A *E.coli*, juntamente com estreptococos do grupo B, são as causas mais comuns de meningite neonatal.

Gastroenterite. As cepas de *E.coli* que causam gastroenterite são subdivididas em, no mínimo, quatro grupos, sendo eles: *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* Enteroinvasivas (EIEC), *E.coli* Enteropatogênicas (EPEC), *E.coli* Enteroemorrágicas (EHEC).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 1. Amostras de *Escherichia coli*

As amostras que foram analisadas fazem parte da coleção do próprio laboratório (Laboratório de Bacteriologia Médica e Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo, Brasil). As 525 amostras foram isoladas de fezes de coelhos. Foram selecionados apenas isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs, de acordo com os critérios do CLSI (2005).

### 2. Determinação dos grupos filogenéticos das amostras de *Escherichia coli* selecionadas, através de PCR.

Conforme metodologia descrita por Clermont (2000), a determinação dos grupos filogenéticos foi feita através de PCR, utilizando os seguintes pares de

primers: ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'); 8 ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'); YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3') e YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'); TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3') e TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), os quais geraram fragmentos de 279, 211 e 152pb, respectivamente.

Cada um dos marcadores descritos acima foi testado individualmente, em reações de 50 µL contendo: 5 µL de DNA molde, lisado por fervura a 10 minutos; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada uma das 4 dNTP; 0,4 µM de cada iniciador; 1,5 u de Taq DNA polimerase (Fermentas) em 10X PCR Buffer e água Milli-Q (q.s.p). Após o ciclo de amplificação, que consistiu de tratamento a 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial e 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (55°C a 30 segundos), extensão (72°C a 30 segundos) e 7 minutos a 72°C para extensão final, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2%), coradas em brometo de etídio e visualizadas em transiluminador UV e fotografadas pelo sistema EDAS Kodak.

### 3. Testes fenotípicos confirmatórios para β-lactamases de espectro estendido

#### 3.1 Testes do disco combinado

Foram utilizados os seguintes discos: cefpodoxima (10µg), ceftazidima (30µg) e cefotaxima (30µg) isoladamente e em associação com ácido clavulânico (10µg) (Oxoid; Basingstoke, Ing). A produção de ESBL foi verificada pelo aumento ( $\geq 5$  mm) no diâmetro do halo de inibição dos discos contendo o antibiótico em combinação com o ácido clavulânico se comparados ao mesmo antibacteriano sem a presença deste inibidor.

### 3.2 Teste sinérgico do duplo disco

Os mesmos discos de antibacterianos citados anteriormente (com exceção ao disco de ácido clavulânico) foram distribuídos a uma distância de 20mm de um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg) (Oxoid; Basingstoke, UK). Qualquer aumento da zona de inibição de um dos antibióticos em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico é indicativo da produção de ESBL. Ambos os testes fenotípicos foram realizados em Agar Mueller-Hinton (Merck; Darmstadt, Germany) e interpretados de acordo com as recomendações do CLSI para testes de disco difusão em Ágar.

## 4. Ensaio para verificação de sensibilidade a antimicrobianos

### 4.1. Disco difusão

Foram preparadas e esterilizadas, segundo recomendações do fabricante, 60 a 70 ml do meio de cultivo Mueller-Hinton Agar, e transferidas para uma placa de Petri de 14 cm de diâmetro interno. Ao transferir para as placas em posição plana, a temperatura do meio mantido em banho-maria deverá estar entre 45-50°C, e este meio deverá ter uma profundidade de aproximadamente 4 mm. Aguardamos a completa solidificação do meio em temperatura ambiente antes de seu uso.

Selecionamos 3 ou 4 colônias semelhantes do organismo sob teste e suspendemos em 3 a 4 ml de solução fisiológica estéril, caldo Mueller-Hinton ou caldo TSB. Comparamos o inóculo ajustado com a escala de MacFarland 0,5 ( $1-2 \times 10^8$  UFC / ml).

Dentro dos 15 minutos após o ajuste da turvação do caldo inóculo, introduzimos nele um suabe e pressionamos nas paredes do tubo a fim de remover o excesso de cultura.

Em seguida foi feito o esfregaço sobre a superfície do meio de cultivo estéril contido na placa. Esta foi girada duas ou mais vezes ao mesmo tempo

em que foi feito o esfregaço. A placa foi coberta de três a cinco minutos para que houvesse uma completa absorção do antibiótico pelo meio.

Os discos foram depositados sobre a superfície da placa com o auxílio de uma pinça estéril, feita leve pressão sobre eles, para uma boa aderência ao meio. As placas foram incubadas em posição invertida a 37°C.

A leitura das placas foi realizada após 18 horas de incubação com o auxílio de uma régua. A leitura é feita medindo-se o diâmetro da zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, sempre em dois sentidos perpendiculares, entre si, calculando-se a média das duas medidas. O limite final da zona de inibição é considerado quando nenhum crescimento visível a olho nu é observado. Os diâmetros das zonas de inibição foram comparados àqueles especificados na Tabela Padrão e informados se o organismo é sensível, intermediário ou resistente.

Cepas controle – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### 5. Identificação de genes codificadores de ESBLs dos tipos TEM, SHV, OXA e CTXM (incluindo CTX-M-15), através de PCR

Foi realizada a PCR para confirmar a presença dos genes codificadores de ESBLs dos tipos TEM, SHV, OXA e CTX-M (incluindo CTX-M-15) em cada isolado. O par de primers 5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG -3' e 5'- CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA -3' foi utilizado para amplificação de uma sequência de 1.076 pares de bases da família TEM.

Para a família SHV foi utilizado o par de primers 5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC -3' e 5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC -3' (930pb) e para a família CTX-M, 5'- ACC GCG ATA TCG TTG GT -3' e 5'- CGC TTT GCG ATG TGCAG -3' (550pb).

Todas as reações foram realizadas com 1µL do DNA de cada microrganismo, primers específicos, 1U de TaqDNA polimerase (Ludwig

Biotec), tampão MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), dNTP (Ludwig Biotec) e água milli-Q em um volume total de 25µL. As condições das reações incluirão 5 minutos de desnaturação a 94°C (95°C para SHV e 7 minutos para CTX-M) seguidos de 35 ciclos (30 ciclos para TEM) de desnaturação (94°C por 30s para TEM e 60 segundos para CTX-M e 95°C por 45 segundos para SHV), anelamento (58°C por 1 minuto para TEM, 59°C por 45 segundos para SHV e 54°C por 45 segundos para CTX-M) e extensão (72°C por 1 minuto), finalizando com um período de extensão final de 72°C por 7 minutos. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Para a confirmação da ESBL do tipo CTX-M-15 O25b, o par de primers utilizado foi rfb.1bis (5'-ATACCGACGACGCCGATCTG-3') e rfbO25b.r (5'-TGCTATTCATTATGCGCAGC-3'), em uma temperatura de anelamento de 60°C, para gerar um produto de PCR de 300pb, conforme descrito por CLERMONT (2006).

Avaliação do padrão dos amplicons de DNA: o produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel Agarose 1% com brometo de etídio (0,5µg/mL) durante 1 hora (6 volts/cm) e visualizado em UV (312nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta, sendo foto documentado

Microrganismos controle: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (blaSHV-18), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* VA1341/03 (CTX-M-1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se que 31 amostras foram CTX-M positivas, 28 amostras foram SHV positivas e 03 amostras foram TEM positivas. Sendo assim, constatamos que de um total de 525 amostras examinadas, 6% foram positivas para o gene CTX-M, 5% positivas para o gene SHV e 1% para o gene TEM.

Estes resultados constituem um dado importante, abrangendo pesquisas nacionais e internacionais. Mesmo sendo considerada uma porcentagem um



tanto quanto baixa, baseando-se no número total de amostras, ficamos relativamente surpresos, pois não há registros tanto quanto sabemos, em amostras animais, tantas amostras carregando genes para CTX-M, SHV e TEM, salvo em publicações de menor divulgação em literaturas específicas.

Algo que também deve ser ressaltado é que embora raro, foram encontradas 7 amostras que produziam CTX-M e SHV ao mesmo tempo. Foi constatada também a coprodução de CTX-M e TEM em apenas uma amostra. Essas coproduções levantam uma hipótese importante que merece ser brevemente analisada. Nos casos da produção de CTX-M e SHV, vários fenômenos podem ter acontecido, a saber:

As amostras coprodutoras de CTX-M e SHV podem ter ocorrido que a produção de uma delas (CTX-M) possa ter o gene inserido no cromossomo bacteriano, ao passo que SHV possa estar no plasmídeo. Esta associação sugere que os genes não devam ter uma incompatibilidade embora em estruturas bacterianas situadas no cromossomo e ou plasmídeos, o que conferiria a uma delas (plasmídeo) certa proteção. Não foram encontradas associações entre SHV e TEM, porém em apenas 01 (uma) amostra houve presença dos genes CTX-M e TEM (APO 218).

Quanto a detecção dos genes que amplificam os produtos CTX-M, SHV e TEM foram encontrados os respectivos amplicons nas figuras 3, 4 e 5. Embora os coelhos dos quais se coletassem as fezes para isolamento das amostras de *Escherichia coli* estivessem em gaiolas separadas, dificultando bastante a infecção cruzada entre gaiolas próximas, os resultados dos géis para CTX-M, SHV e TEM merecem algumas considerações.

Não foi feita ainda a identificação dos animais positivos, acreditamos que seja possível que algumas das reações em coelhos subsequentes seja devida a possibilidade de que estes animais fossem da mesma granja. Em nossa opinião todos os resultados foram extremamente interessantes, e nos arremete, numa eventual continuidade do trabalho, a pesquisar quais “subtipos” das amostras CTX-M, SHV e TEM.

Este estudo revela que a disseminação dessas cepas caminha por todo o mundo, acompanhando o desenvolvimento deste. Com o aumento exponencial do fluxo de pessoas e animais ao redor do globo, cabe às autoridades de saúde, empenhar esforços para pesquisas e desenvolvimentos de práticas terapêuticas para o tratamento dessas cepas.

O uso racional de antibacterianos deve ser levado em conta, pois estudos têm sugerido que a pressão seletiva causada pelo uso constante de cefalosporinas nos centros de saúde contribui para o aparecimento e disseminação desses microrganismos resistentes<sup>10</sup> observaram que a resistência bacteriana causada pela produção de ESBL pode aumentar num período de 2 anos em até 57% em um único hospital. A presença de microrganismos que expressam novas enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, vem cada vez mais sendo observada<sup>11</sup>.

Na era dos antibióticos, as  $\beta$ -lactamases mostraram ser extremamente adaptáveis. Apareceram em novos hospedeiros, mudaram sua expressão para níveis mais altos, alteraram sua susceptibilidade aos inibidores e aumentaram o leque de seus substratos. Os principais tipos moleculares das  $\beta$ -lactamases nos patógenos Gram-negativos são codificados por genes localizados em plasmídeos conjugáveis ou transposons, facilitando assim, a disseminação da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, mas também promovendo a co-seleção em relação a outros antibióticos. As bactérias são capazes de evolução rápida em resposta à pressão seletiva exercida pelo uso generalizado de antibióticos, e assim, as mudanças continuadas observadas nas características das  $\beta$ -lactamases não devem ser surpresas.

A avaliação dos tratamentos para o combate às infecções devido aos microrganismos que produzem ESBL é complicada pela diversidade dos tipos dessa enzima e pela variedade de fatores que podem modificar sua expressão. Os resultados podem ser influenciados pelo tipo de infecção e dependendo se o paciente está infectado ou apenas colonizado. Frequentemente os pacientes estão infectados com vários patógenos, necessitando de múltiplos agentes

antimicrobianos. Também é importante mencionar que trocas significativas de uso de antibióticos também exercem uma pressão seletiva para novos microrganismos resistentes<sup>12</sup>.

Por outro lado não pode ser esquecida a troca de informações genéticas entre microrganismos, com transferência de genes para novos hospedeiros, e as mutações que podem ocorrer nos genes de resistência, ampliando seu espectro de resistência<sup>13</sup>.

### Referência bibliográfica

- <sup>1</sup>(PRESCOTT, 1978; PEETERS et al., 1988; CAMGUILHEM e MILON, 1989; BLANCO et al.,1997<sup>a</sup>).
- <sup>2</sup>(PEETERS, 1987, 1993; BLANCO et al., 1993b).
- <sup>3</sup> (JAWETZ et al., 1995).
- <sup>4</sup> (MINARINI et al., 2007).
- <sup>5</sup> (CARATTOLI, 2008).
- <sup>6</sup>(BUSH, K. b-lactamase inhibitors from, laboratory to clinic. *Clinic Microbiol. Rev.*, 1: 109-123, 1988.
- <sup>7</sup>WILLIAMS, J.D. B-lactamases and B-lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12: 3-7, 1999.
- <sup>8</sup> (POETA et al. 2008).
- <sup>9</sup>(SIQUEIRA et al. 2008).
- <sup>10</sup>(RICE, L.B.; WILEY, S.H.; PAPANICOLAOU, G.A., et al., Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 2193-2199, 1990).
- <sup>11</sup>(RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:223-232, 1997).
- <sup>12</sup>JACOBY ,G.A. Desenvolvimento da resistência em patógenos Gram-negativos. Relatório especial de Hospital Practice "Patógenos emergentes nas doenças infecciosas", McGraw-Hill Company, p. 14-19, 2000.
- <sup>13</sup>DeFLAUN, M.F.; LEVY, S.B. Genes and their varied hosts. In: Levy S.B., Miller, RV. Eds. *Gene transfer in the environment* New York, McGraw Hill Publishing, p. 1-32,1989.

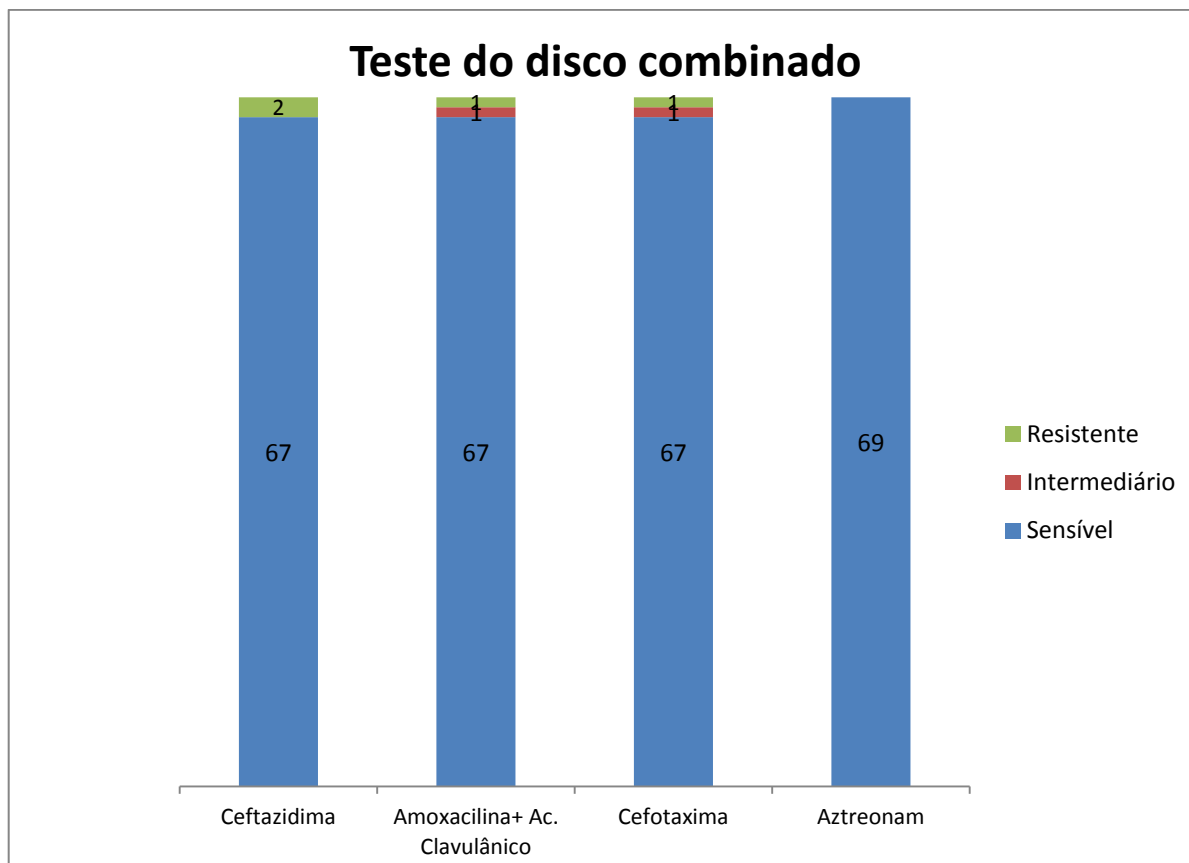


Figura 1. Reação das amostras ao teste do disco combinado

Tabela Padrão para interpretação de halos de Inibição

Antibacterianos (p/ Gram-negativos)	Resistente (mm)	Intermediário (mm)	Sensível (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (mm)	<i>E. coli</i> ATCC 26922 (mm)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)
Ácido Nalidixico (NAL)	≤ 13	14-18	≥ 19	-	22-28	-
Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC)	≤ 13	14-17	≥ 18	28-36	19-25	-
Ampicilina (AMP)	≤ 13	14-16	≥ 17	27-35	16-22	-
Cefalotina (CFL)	≤ 14	15-17	≥ 18	29-37	15-21	-
Ceftazidima (CAZ)	≤ 14	15-17	≥ 18	16-20	25-32	22-29
Ceftriaxona (CRO)	≤ 13	14-20	≥ 21	22-28	29-35	17-23
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 15	16-20	≥ 21	22-30	30-40	25-33
Cloranfenicol (CLO)	≤ 12	13-17	≥ 18	19-26	21-27	-
Estreptomicina (EST)	≤ 11	12-14	≥ 15	14-22	12-20	-
Gentamicina (GEN)	≤ 12	13-14	≥ 15	19-27	19-26	16-21
Sulfametoxazol + Trimetoprina (SUT)	≤ 10	11-15	≥ 16	24-32	24-32	-
Tetraciclina (TET)	≤ 14	15-18	≥ 19	24-30	18-25	-



Figura 2. Antibiograma da Amostra APO243 indicando relativo aumento na zona de inibição de um dos antibióticos em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), é considerado indicativo da produção de ESBL.

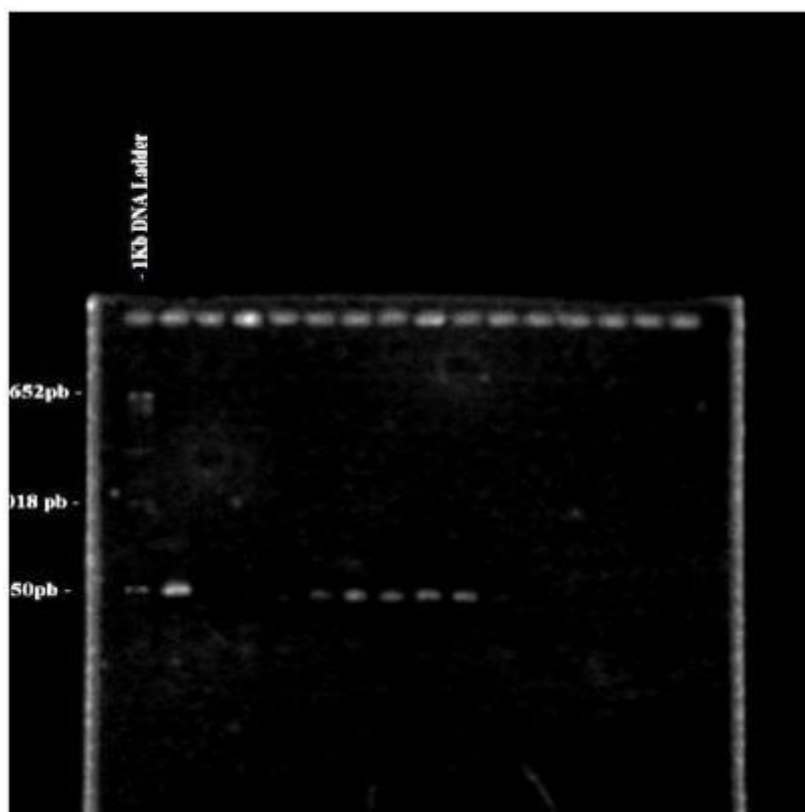


Figura 3. Reação de PCR para determinação da presença de ESBLs nas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos utilizando o gene que codifica Betalactamase do tipo

## CTX-M.

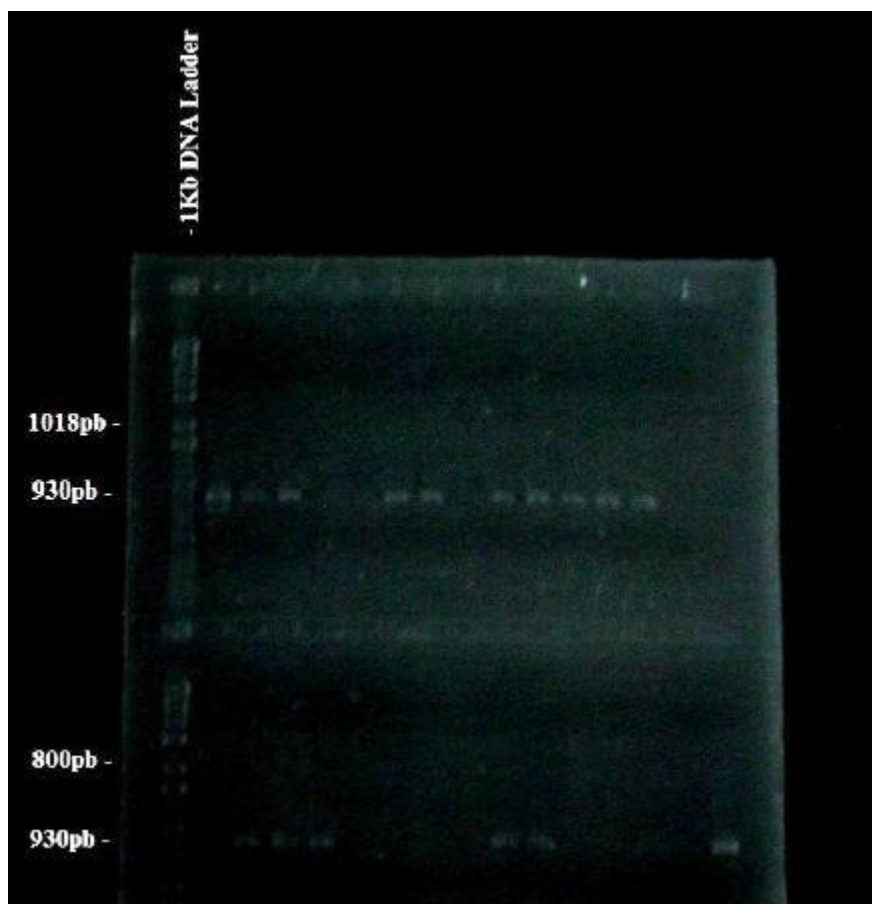


Figura 4. Reação de PCR para determinação da presença de ESBLs nas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos utilizando o gene que codifica Betalactamase do tipo SHV.

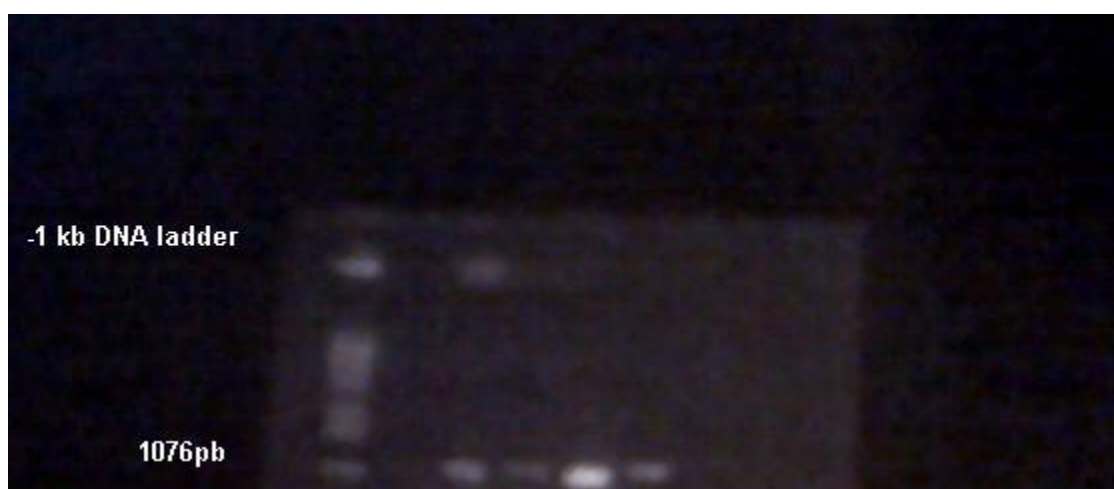


Figura 5. Reação de PCR para determinação da presença de ESBLs nas amostras de *E. coli* isoladas utilizando o gene que codifica Betalactamase do tipo TEM.