
BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO: PREVALÊNCIA E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE SCREENING

ROSÂNGELA CAMINOTTO BARBOSA¹
CLAUDIA MARIA CORREIA E SILVA²
SILVIA MICHIKO HIZUKA²
EMERSON DANGUY CAVASSIN³
MÁRCIA REGINA ECHES PERUGINI⁴

BARBOSA, R. C.; SILVA, C. M. C.; HIZUKA, S. M.; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M. R. E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de screening. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 17-24, jun. 1999/2000.

RESUMO: As Beta-lactamases de Espectro Ampliado podem produzir uma oculta, mas clinicamente significativa, resistência à cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam. Estas enzimas são produzidas principalmente por *Klebsiella sp* e *Escherichia coli*. Critérios interpretativos modificados para um grupo chave de antibióticos ou o uso de testes especiais de susceptibilidade antimicrobiana devem ser usados para aumentar a sensibilidade de detecção das ESBL. 735 isolados de *E. coli* e 192 de *Klebsiella sp* foram estudados para determinar a prevalência de ESBL no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná. Os resultados obtidos indicam 2,99% de *E. coli* e 36,46 % de *Klebsiella sp* produtoras de ESBL. Usando um grupo de 156 amostras de *E. coli* e 74 de *Klebsiella sp*, comparou-se 3 métodos de triagem para detecção de ESBL: teste de sinergia de duplo disco, disco difusão (ambos realizados com ceftazidima, cefotaxima e aztreonam) e painel de microdiluição MicroScan realizado com ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima). Os resultados deste estudo sugerem que os 3 métodos de triagem podem ser igualmente utilizados por laboratórios clínicos em isolados de *E. coli* e *Klebsiella sp*.

PALAVRAS-CHAVE: Beta-lactamase; Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL); beta-lactâmicos; mecanismos de resistência; *Klebsiella sp*; *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

Desde a introdução da penicilina G até as cefalosporinas de quarta geração, vem-se observando uma crescente perda de atividade destas drogas, na dependência da pressão seletiva imposta sobre as populações bacterianas (Mendonça, 1996).

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativo, aos agentes beta-lactâmicos (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995).

Nos últimos 10 anos, tem ocorrido um aumento na prevalência de cepas produtoras de uma beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), de codificação plasmidial, derivada das beta-lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1). As ESBLs estão incluídas no grupo 2be de BUSH e possuem ação hidrolítica ampliada a todos os beta-

lactâmicos, incluindo cefalosporinas de quarta geração e monobactams, com exceção das cefamicinas e carbapenems. Outra característica fenotípica importante, é que elas permanecem sensíveis a ação de inibidores de beta-lactamases (Philippon, 1989; Blatt, 2000; Jacoby, 2000; Livermore, 2000; Silva, 2000).

Estas enzimas ocorrem predominantemente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, mas podem também ser encontradas, com menor frequência, em outras espécies de Enterobactérias como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Salmonella spp.* e *Serratia marcescens* (Thomson, 1997; Vercauteren *et al.*, 1997).

As ESBLs foram descritas pela primeira vez, em isolados de *Klebsiella* na Alemanha em 1983, tendo a primeira grande eclosão ocorrido na França em 1985-87. Cepas com estas enzimas foram relatadas

¹ Aluna do Curso de Especialização em Análises Clínicas do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia (PALD), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

² Acadêmicas do Curso de Farmácia e Bioquímica da UEL.

³ Microbiologista do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (HURNP).

⁴ Professora Adjunta da disciplina de Microbiologia Clínica do Departamento de Patologia Aplicada Legislação e Deontologia, do Centro de Ciências da Saúde da UEL.

pela primeira vez nos Estados Unidos em 1989-90. Entre os anos de 1988 e 1990 foram detectadas na Espanha os primeiros isolamentos de enterobactérias produtoras de ESBL (Knothe *et al.*, 1983; Livermore, 1995; Sirot *et al.*, 1987; Petit *et al.*, 1990).

Bactérias produtoras de ESBL tem sido isoladas com maior freqüência em amostras provenientes de pacientes hospitalizados, porem também podem ser encontradas em amostras de origem comunitária. Pacientes submetidos a um consumo de antibióticos (principalmente cefalosporinas, em especial ceftazidima) e a cateterização arterial e/ou urinária, possuem maior risco de adquirir infecção ou mesmo colonização por bactérias ESBL. (Silva, 2000).

As beta-lactamases de espectro estendido representam um sério problema clínico nos hospitais. Por ser codificada por plasmídios, esta resistência pode ser transferida facilmente, por conjugação, entre diferentes espécies bacterianas. Além disto, estes plasmídios podem ter, associados, genes de resistência a outros tipos de antimicrobianos. (Silva, 2000).

Os testes de sensibilidade disponíveis atualmente, apresentam limitações na detecção de resistência mediada por estas enzimas (Blatt, 2000; Sader, 1998). Algumas cepas produtoras de ESBL podem mostrar um baixo nível de resistência que pode não alcançar os "breakpoints" para resistência, preconizados atualmente pelo NCCLS e serem reportadas como sensíveis. Esta falsa sensibilidade pode acarretar falha terapêutica quando infecções causadas por cepas produtoras de ESBL são tratadas com beta-lactâmicos (Blatt, 2000; Sader, 1998; Sader, 2000a; Sader, 2000b).

Vários métodos de triagem para pesquisa de ESBL têm sido propostos (Jacoby, 1996; NCCLS, 2000; Thomson *et al.*, 1996). Entre estes métodos, tem-se o uso de "breakpoints" modificados, estabelecidos pelo NCCLS (NCCLS, 2000; Thomson *et al.*, 1996), teste de dupla difusão (Jarlier *et al.*, 1988), teste tridimensional (Thomson & Sanders, 1992) e o método de triagem com fitas ETEST (Silva, 2000; Vercauteren *et al.*, 1997)

Tendo em vista a alta freqüência de *Escherichia coli* e *Klebsiella sp* no HURNP e a alta prevalência de ESBL que tem sido reportada nestes gêneros por diversos autores (Emery & Weymouth, 1997; Sirot *et al.*, 1992), o presente estudo tem por objetivo, determinar a prevalência de ESBL no HURNP, bem como comparar a habilidade dos métodos de triagem em ágar disco difusão e microdiluição automatizada com "breakpoints" modificados (NCCLS-2000) e teste de dupla difusão, em detectar a expressão desta enzima.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas:

Foram incluídas neste estudo, 735 amostras de *Escherichia coli* e 192 de *Klebsiella sp*, isoladas de diversos materiais biológicos, obtidos de pacientes internados e atendidos no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, durante o ano de 2000.

Das 927 amostras bacterianas analisadas, 156 *Escherichia coli* e 77 *Klebsiella sp* foram selecionadas para serem submetidas aos testes comparativos para pesquisa de ESBL.

Identificação das amostras:

A identificação em gênero e espécie foi realizada por metodologia manual, segundo orientações do Manual of Clinical Microbiology (Murray *et al.*, 1999), sendo confirmada através de método automatizado Dade Behring MicroScan, utilizando os painéis NC 20 e NUC 1.

Após identificadas, as amostras foram estocadas a -20°C em caldo TSB com 30% de glicerina.

Controle de qualidade:

Amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922 e ATCC 35218, foram utilizadas como controle de qualidade neste estudo.

Métodos de detecção de ESBL:

- 1- DISCO DIFUSÃO : Os halos de inibição para cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, foram medidos e analisados de acordo com os "breakpoints" indicativos da produção de ESBL estabelecidos pelo NCCLS-2000, ou seja, são suspeitas de ESBL as cepas com sensibilidade diminuída, apresentando um halo = 22 mm para ceftazidima, = 27 mm para aztreonam e cefotaxima. (Mendes *et al.*, 1998; Blatt, 2000; Aguilera & Trindade, 2000; NCCLS, 2000).
- 2- MICRODILUIÇÃO AUTOMATIZADA: A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo Sistema MicroScan (Dade Behring), usando painéis desidratados para gram-negativo NC 20 e NUC 1, lidos pelo Walkaway 40 e interpretados de acordo com os critérios do NCCLS 2000. A recomendação do NCCLS para a detecção de bactérias suspeitas de produzirem ESBL, inclui que isolados clínicos de *Klebsiella spp.* e *Escherichia coli* com MIC aumentados (= 2 ug/ ml) para qualquer uma das drogas padronizadas do sistema, ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona, devem ser consideradas suspeitas.

3- APROXIMAÇÃO DE DISCOS OU DUPLA DIFUSÃO: Em placa de Mueller-Hinton Agar (Difco), foram dispensados discos de ceftazidima 30 ug, cefotaxima 30 ug e aztreonam 30 ug, ao redor de um disco central de amoxicilina 20 ug / ácido clavulânico 10 ug, distantes deste, 20 mm de bordo a bordo. Considerou-se teste positivo para ESBL, sinergia positiva, a presença de ampliação e/ou distorção do halo de inibição de um ou mais antimicrobianos testados ou, ainda, o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição entre o disco de amoxicilina+ácido clavulânico e o disco de uma das drogas beta-lactâmicas (“ghost-zone”).

4- Fitas ETEST: Esta metodologia foi utilizada como referência ouro, nos casos em que houve discordância de resultados. Uma suspensão bacteriana, com turbidez correspondente à 0.5 da escala de McFarland, foi semeada em uma placa de Mueller-Hinton Ágar. Após um intervalo de 15 minutos, foi dispensada a fita de ETEST, que apresenta gradientes de concentrações estáveis de ceftazidima (0,5 ug/ml a 32 ug/ml) em uma das extremidades e ceftazidima (0,125 ug/ml a 8 ug/ml) associada a uma concentração fixa de ácido clavulânico (2 ug/ml) na extremidade oposta. Conforme instruções do fabricante, a MIC foi determinada como sendo a primeira

concentração acima da intersecção entre a fita de ETEST e a zona elíptica de inibição de crescimento bacteriano. A amostra foi considerada produtora de ESBL, quando ocorreu uma redução da MIC de ceftazidima, 2,5 diluições logarítmicas na presença de ácido clavulânico em comparação com a MIC de ceftazidima. Em casos onde ambas as MIC apresentaram valores abaixo dos gradientes de antimicrobianos presentes na fita, a redução foi considerada zero.

RESULTADOS

Das 735 amostras de *Escherichia coli* testadas, 22 (2,99 %) foram positivas para ESBL por um ou mais dos métodos de triagem (Figura 1). Das 192 *Klebsiella* sp analisadas, 70 (36,46 %) se mostraram produtoras da enzima (Figura 2).

Considerando as 156 amostras de *Escherichia coli* analisadas comparativamente pelos métodos de detecção de ESBL, 12 (7,69 %) foram positivas pelo método de disco difusão e 9 (5,76 %) pela aproximação de discos. A microdiluição automatizada MicroScan foi realizada em 75 destas amostras, das quais somente 5 (6,66%) foram consideradas positivas para ESBL (Figura 3).

Das 74 amostras de *Klebsiella* sp submetidas aos testes comparativos, 46 (62,16%) foram positivas

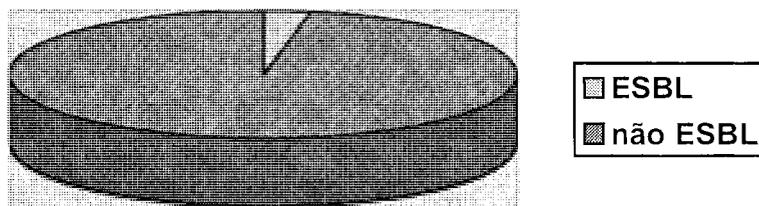


Figura 1 – Prevalência de ESBL entre 735 amostras de *E. coli*

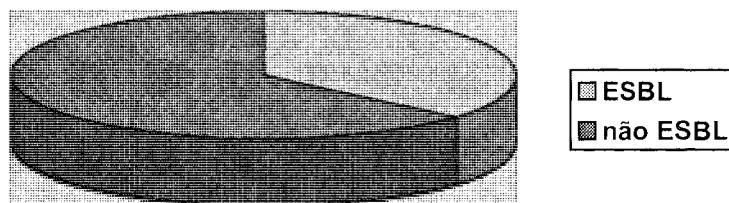


Figura 2 – Prevalência de ESBL entre 192 amostras de *Klebsiella* sp.

por disco difusão e 42 (56,75%) pela aproximação de discos. Destas amostras, 25 foram testadas por microdiluição automatizada, das quais 13 (52%) foram consideradas produtoras da enzima (Figura 4). Estes resultados não representam prevalência, uma vez que os microorganismos não foram coletados de maneira consecutiva.

Comparando-se os métodos de disco difusão e microdiluição automatizada, observou-se concordância em 100% das amostras de *Escherichia coli* (Tabela 1) e de *Klebsiella sp* (Tabela 2).

Com relação aos métodos de disco difusão e

aproximação de discos (DDS), notou-se concordância absoluta entre as amostras negativas para ESBL por ambos os métodos, porém houve discordância em 3 das amostras positivas de *Escherichia coli* (Tabela 3) e 4 das amostras de *Klebsiella sp* (Tabela 4).

Comparando o teste de microdiluição automatizada com a dupla difusão (DDS), embora todas as amostras negativas das 2 bactérias apresentem concordância de 100% entre os dois métodos, observou-se discordância em 3 amostras de *Escherichia coli* (Tabela 5) e 2 de *Klebsiella sp* (Tabela 6) na análise dos resultados.

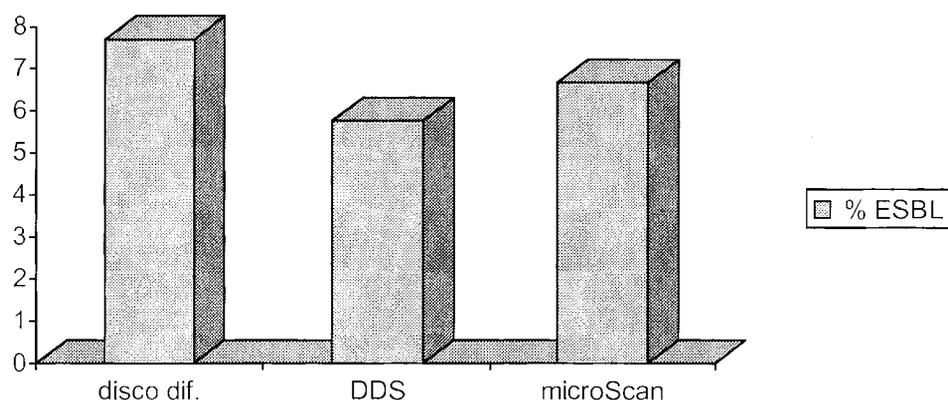


Figura 3 – Positividade de ESBL pelos métodos de triagem em 156 amostras de *E. coli*

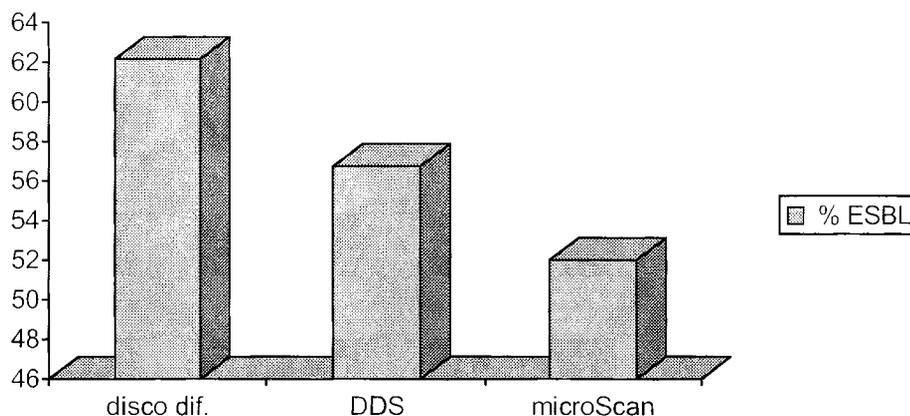


Figura 4 – Positividade de ESBL pelos métodos de triagem em 74 amostras de *Klebsiella sp*

Tabela 1 – Comparação entre os métodos de disco difusão e microdiluição em 75 amostras de *E. coli*.

MICRODILUIÇÃO	DISCO DIFUSÃO		TOTAL
	+	-	
+	05	00	05
-	00	70	70
TOTAL	05	70	75

Tabela 2 – Comparação entre os métodos de disco difusão e microdiluição em 25 amostras de *Klebsiella sp.*

MICRODILUIÇÃO	DISCO DIFUSÃO		TOTAL
	+	-	
+	13	00	13
-	00	12	12
TOTAL	13	12	25

Tabela 3 – Comparação entre os métodos de disco difusão e aproximação de discos (DDS) em 156 amostras de *E. coli*

DISCO DIFUSÃO	DDS		TOTAL
	+	-	
+	09	03	12
-	00	144	144
TOTAL	09	147	156

Tabela 4 – Comparação entre os métodos de disco difusão e aproximação de discos(DDS) em 74 amostras de *Klebsiella sp.*

DISCO DIFUSÃO	DDS		TOTAL
	+	-	
+	42	04	46
-	00	28	28
TOTAL	42	32	74

Tabela 5 – Comparação entre os métodos de microdiluição e aproximação de discos (DDS) em 75 amostras de *E. coli*.

MICRODILUIÇÃO	DDS		TOTAL
	+	-	
+	02	03	05
-	00	70	70
TOTAL	02	73	75

Tabela 6 – Comparação entre os métodos de microdiluição aproximação de discos (DDS) em amostras de *Klebsiella sp.*

MICRODILUIÇÃO	DDS		TOTAL
	+	-	
+	11	02	13
-	00	12	12
TOTAL	11	14	25

quantitativamente mensurado (Reis, 1999), além de ser influenciado pela distância entre os discos. Segundo alguns autores (Moland *et al.*, 1998), utilizando o "breakpoint" = 2 ug/ml recomendado pelo NCCLS para detectar a maioria das ESBL (82 a 91%), o MicroScan pode incluir nesta detecção, outras enzimas que não ESBL, como AmpC beta-lactamase. No trabalho, os autores recomendam a utilização de outros valores como um "breakpoint" de = 4 ug/ml para ceftazidima, a fim de eliminar possíveis falsos positivos.

Devido à sua acurácia, o ETEST seria o método mais indicado para a pesquisa de ESBL, porém em virtude do alto custo das fitas, o uso de "breakpoints" modificados para os testes de triagem, disco difusão e determinação da MIC, embora não sejam confirmatórios da produção de ESBL, representam uma opção bastante prática para os laboratórios de rotina, pois não implica em mudanças na realização

dos testes (Reis, 1999). Em nosso trabalho, os métodos utilizados apresentaram boa concordância, em relação aos substratos testados, podendo ser implantados em laboratórios de rotina de nossa região, como triagem na detecção de amostras suspeitas de ESBL.

Considerando a alta prevalência de ESBL e as possíveis falhas terapêuticas, é essencial o trabalho conjunto do laboratório e do clínico em estudos epidemiológicos e identificação precoce destas cepas, a fim de orientar as medidas a serem implementadas pelas comissões de controle de infecção hospitalar, como no uso indiscriminado de antibióticos, principalmente se atentarmos para o fato de que muitos genes ESBL localizam-se em plasmídios de ampla multi-resistência, os quais também codificam resistência para outros antibióticos (Aguilera & Trindade, 2000, Jacoby, 2000, Patterson, 2000).

BARBOSA, R. C.; SILVA, C. M. C.; HIZUKA, S. M.; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M. R. E. Extended-spectrum Beta-lactamases: prevalence and comparison of screening for detection. *Semina: Ci. Biol. Saúde, Londrina*, v. 20/21, n. 2, p. 17-24, jun. 1999/2000.

ABSTRACT: *The Extended Spectrum Beta-lactamases may produce hidden but clinically significant resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam. This enzymes are produced mainly by Klebsiella and Escherichia coli. Modified interpretive criteria for key antibiotics or the use of special antimicrobial susceptibility tests should be used to increase the sensitivity of ESBL detection. 735 isolates of Escherichia coli and 192 of klebsiella sp were studied for determine the prevalence of ESBL in HURNP. The results obtained indicate 2,99 % of E. coli and 36,46 % of Klebsiella sp that encode for resistance to broad-spectrum beta-lactam antibiotics. Using a set of 156 strains of E. coli and 74 of Klebsiella sp, we compared three screening methods for ESBL detection: a double-disk synergy test, disk diffusion (both test were performed with ceftazidime, cefotaxime and aztreonam) and MicroScan microdilution panels (performed with ceftazidime and ceftriaxone e/ou cefotaxime). The results of this study suggest that three screening methods can be equally used by clinical laboratories as na indicator of extended-spectrum beta-lactamases, in isolates of E. coli and Klebsiella sp.*

KEY WORDS: *Beta-lactamase; Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL); Beta-lactam; resistance mechanisms; Klebsiella sp; Escherichia coli.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, L.; TRINDADE, N. Informações sobre Beta-lactamases de espectro estendido, induzidas e outras informações. *LAES & HAES*, v.39, p. 244-248, 2000.
- BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das Beta-lactamases de espectro ampliado. *NewsLab*, v. 40, p. 86-97, 2000.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional classification scheme for Beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1211-1233, June, 1995.
- EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.*, v.35 p. 2061-2067, 1997.
- JACOBY, G. A.; HAN, P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Jor. Clin. Microbiol.*, v.34, p. 908-911, 1996.
- JACOBY, G. A. Desenvolvimento da resistência em patógenos gram-negativos - Beta-lactamases de amplo espectro. *Hospital Practice.*, p. 14-21, jul. 2000.
- JACOBY, G. A., and MEDEIROS, A. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 1697-1704, 1991.
- JARLIER, V.; NOCOLAS, M. H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum Beta-lactamases conferring

- transferable resistance to newer Beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Ver. Infect. Dis.* v.10, p. 867-878, 1988.
- KNOTHE, H.; SHAH P.; KREMERY V.; ANTAL M.; MITSHASHI S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole, and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, v.11, p. 315-317, 1983.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 557-584, Oct. 1995.
- MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J. *Manual de microbiologia clínica aplicada ao controle de infecção hospitalar*. [S.l.: s.n.], 1998. p. 46-61
- MENDONÇA, J. S. Conquistas Recentes da Moderna Antibioticoterapia. *Moderna Antibioticoterapia*, v. 1, n. 3, p. 1-8, 1996.
- MOLAND, E. S.; SANDERS, C. C.; THOMSON, K. S. Can results obtained with commercially available microScan microdilution panels serve as an indicator of Beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam?. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36 p. 2575-2579, Sept. 1998.
- MURRAY, P. R.; BARAN, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEM, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. [S.I.] American Society of Microbiology, , 1999.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS ESBL Working Group. Annual meeting, subcommittee on antimicrobial susceptibility testing. [S.l.: s.n.], 1997.
- _____. Methods dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobic. Approved standard M 100-S10, 2000.
- PATTERSON, J. E. Beta-lactamases de amplo espectro: intervenções bem sucedidas em casos de resistência de gram-negativos, tratamento, controle e prevenção. *Hospital Practice*, p.22-27, jul., 2000.
- PETIT, A.; GERBAUD G.; SIROT D.; COURVALIN P.; SIROT J. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 219-224, 1990.
- PHILIPPON, A.; LABIA R.; JACOBY G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989.
- PRAGAI, Z.; KOCZIAN, Z.; NAGY, E. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamases and determination of the antibiotic susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Hungary. *J Antimicrob. Chemother.*, v. 42, p. 401-403, 1998.
- REIS, A. O. *Avaliação dos testes laboratoriais para detecção de amostras de Klebsiella pneumoniae produtoras de Beta-lactamases de espectro ampliado*. 1999. Tese (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- SADER, H. Extend-spectrum beta-lactamases: a potent antimicrobial resistance mechanism that is spreading rapidly. *Publicacion del comité de microbiologia clínica de la API*. 1998.
- SADER, H. S. Principais problemas de resistência bacteriana encontrados pelo Programa SENTRY no Brasil. *SENTRY News*, v. 2. p. 1-7, 2000a.
- _____. Principais problemas de resistência bacteriana encontrados pelo Programa SENTRY no Brasil. *SENTRY News*, v.1, p. 3. 2000 b.
- SILVA, C. H. P. M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 32, n.3, p. 215-219, 2000.
- _____; SALVINO, C. R. Importância do reconhecimento das enterobactérias hospitalares produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e suas implicações terapêuticas. *News Lab.*, v. 41, p. 104-112, 2000.
- SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; MORAND, A.; COURVALIN, P.; DARFEUILLE, M. A.; PERROUX, R.; CLUNZEL, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 20, p. 323-334, 1987.
- THOMSON, K. S. New plasmid-mediated beta-lactamases of gram-negative pathogens: clinical and laboratory implications. *Dade MicroScan Inc.*, 1997.
- THOMSON, K. S.; PREVAN, A. M.; SANDERS, C. C. Novel plasmid-mediated Beta-lactamases in Enterobacteriaceae: emerging problems for new Beta-lactam antibiotics. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, v. 16, p. 151-163, 1996.
- THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. Detection of extended-spectrum Beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 36, p.1877-1882, 1992.
- VERCAUTEREN, E.; DESCHEEEMAEKER, P.; IEVEN, M.; SANDERS, C. C.; GOOSSENS, H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum Beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n. 9, p. 2191-2197, 1997.