

# Identificação Laboratorial de $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) - Revisão

## Laboratory Identification of Extended-Spectrum $\beta$ -lactamases - A review

Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>1</sup>; Solange Lúcia Blatt<sup>2</sup> & Caio Maurício Mendes de Córdova<sup>3</sup>

**RESUMO** - Segundo vários autores (BELL *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2004; BRIGANTE *et al.*, 2005), a incidência de bactérias produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) é distinta nas diversas áreas geográficas estudadas. As Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) produzidas por bacilos gram negativos estão entre os grandes problemas da medicina atual. Quando produtoras destas enzimas, os microorganismos (principalmente *K. pneumoniae* e *E. coli*) tornam-se altamente eficazes em inativar as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração. Além disso, as bactérias produtoras de ESBLs são frequentemente resistentes à diversas classes de antibióticos não Beta-Lactâmicos, causando grande dificuldade no tratamento destas infecções. O grande objetivo deste artigo é alertar os laboratórios de análises clínicas para as dificuldades na detecção rotineira deste fenômeno e a grande relevância clínica desta detecção para a saúde do paciente, além de sua enorme importância no controle das infecções hospitalares causadas por cepas produtoras de beta-lactamases.

**PALAVRAS-CHAVE** - Beta-Lactamases de Espectro Estendido, Resistência, Enterobactérias, Infecção Hospitalar.

**SUMMARY** - According to some authors (BELL *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2004; BRIGANTE *et al.*, 2005), the incidence of producing bacteria of Beta-Lactamases de Extended Spectrum (ESBLs), is distinct in the diverse studied geographic areas. Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), produced for gram negative bacilli, is between the great problems of the current medicine. When producing of these enzymes, the microorganisms (mainly *K. pneumoniae* and *E. coli*) become highly efficient in inactivating penicillins, cephalosporines of first, second and third generation. Moreover, the producing bacteria of ESBLs are frequent resistant the diverse non-Beta-Lactamic antibiotic, causing great difficulty in the treatment of these infections. The great objective of this article, is to alert the laboratories of clinical analyses for the difficulties in the routine detection of this phenomenon, the great clinical relevance of this detection for the health of the patient, beyond its enormous importance in the control of the hospital infections caused by beta-lactamase producers.

**KEYWORDS** - Extended-Spectrum,  $\beta$ -Lactamases, Antibiotic-Resistance, Enterobacteriaceae, Hospital Infection.

### INTRODUÇÃO

Dentre as bactérias Gram-negativas, a produção de Beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes beta-lactâmicos (SANDERS e SANDERS, 1992). Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam Beta-lactamases codificadas por plasmídeos que conferem resistência à penicilinas mas não às cefalosporinas de amplo-espectro (BUSH *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1983, um novo grupo de enzimas logo nomeadas de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE *et al.*, 1983). Mais tarde, estas enzimas foram mapeadas e classificadas em dois grandes grupos, não relacionados entre si, embora algumas enzimas dos dois grupos, ajam sobre o mesmo substrato (antibiótico beta-lactâmico), ligando-se a estes antibióticos em sítios completamente distintos. Este grupo de enzimas foi primeiramente referido como resultado de genes presentes em plasmídeos, como o TEM-1, TEM-2 e SHV-1, os quais sofreram mutações semelhantes, resultando em substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo destas enzimas. Estas alterações (mutações), causam modificações estruturais no sítio ativo, causando acréscimo de sua ação sobre as cefalosporinas. Como resultado, sua ação não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração mas, também, sobre as oxiamino-cefalosporinas (Cefotaxima, Cefotaxidima, Ceftriaxona) e monobactams (Aztreonam) (STÜRENBURG e MACK, 2003). As ESBLs, geralmente podem ser bloqueadas por inibidores de beta-lactamases, como o clavulanato, sulbactam e

tazobactam, que são geralmente ineficazes contra a classe "C" destas enzimas. Além disso, as bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência à outras drogas não-beta-lactâmicas, o que causa um verdadeiro dilema no que diz respeito à terapêutica a ser utilizada nestes casos.

Nos últimos 20 anos, inúmeros fármacos beta-lactâmicos têm sido desenvolvidos com o propósito principal de possuírem resistência à ação hidrolítica das enzimas beta-lactamases. Infelizmente, a utilização indiscriminada e sem critérios de tais fármacos, também tem favorecido a seleção de bactérias produtoras de (ESBLs) até então desconhecidas e resistentes a estes fármacos (MEDEIROS, A. 1997). A primeira mutação observada na produção de ESBLs foi a enzima denominada SHV-2, a qual foi encontrada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, isolada na República Federal da Alemanha, em 1983 (LIVERMORE, D. M., 1995). A primeira ESBL "mutante" identificada em um hospital universitário foi isolada em Julho de 1984, na França, a qual foi posteriormente caracterizada molecularmente como TEM/CTX-1 (SANDERS, C. *et al.*, 2000).

A partir destes primeiros achados estritamente hospitalares, o isolamento deste fenômeno vem se tornando cada vez mais comum, inclusive em ambientes ambulatoriais. Além disso, este fenômeno já foi encontrado em diversos gêneros de Enterobactérias, como em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, e também em bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose, como o *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER R. P., 1980).

### Epidemiologia das ESBLs

A nível mundial, a incidência de microorganismos produ-

Recebido em 04/07/2005

Aprovado em 25/04/2006

<sup>1</sup>Professor de Microbiologia Clínica; <sup>2</sup>Professora de Citologia Clínica; <sup>3</sup>Professor de Bioquímica Clínica.

<sup>1,2,3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

tores de ESBLs é muito difícil de se determinar, principalmente, por diferenças entre os métodos de detecção e interpretação utilizados por cada um dos países e instituições de saúde envolvidos, além de diferirem muito em relação à notificação do aparecimento de tal fenômeno. Por estes motivos, a ocorrência de ESBL é mundialmente sub-estimada (STEWART *et al.*, 2000). Uma outra razão para o fato, é a alta taxa de variação na incidência de ESBLs nos diferentes hospitais, que é observado pela escolha dos participantes na coleta dos dados, que tem grande influência sobre a média dos dados obtidos. Não obstante, nas mais recentes avaliações, o aumento significativo no aparecimento das ESBLs tem sido reportada em todas as partes do mundo, incluindo a América do Norte (Taxa de ESBL em *Klebsiella spp.* = 4.2 - 44%, *E.coli* = 3.3 - 4.7% e *Proteus mirabilis* = 3.1 - 9.5%) (WINOKUR *et al.*, 2001; MATHAI *et al.*, 2001; SAURINA *et al.*, 2000) e América do Sul/Latina (Taxa de ESBL em *Klebsiella spp.* = 40 - 47.3%, *E.coli* = 6.7 - 25.4% e *Proteus mirabilis* = 9.5 - 35.5%) (WINOKUR *et al.*, 2001; SADER *et al.*, 2003, 2002; GALES *et al.*, 2002).

### Caracterização e tipos de ESBLs

As ESBLs "clássicas" são enzimas transmitidas/codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA). Dentro destas maiores "famílias", estão incluídas as duas primeiras variantes de beta-lactamases identificadas (SIROT *et al.*, 1987; SOUGAKOFF *et al.*, 1988). Embora estas variantes ainda se mantêm, nos dias atuais, como as mais isoladas, nos últimos anos houve uma explosão no desenvolvimento/aparecimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Como resultado disso, mais de 370 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente (STÜRENBURB *et al.*, 2005).

Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta-lactamases denominadas "Serine-Beta-Lactamases" que, juntamente com as "Metallo-Beta-Lactamases", formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH *et al.*, 2004).

A evolução das Beta-Lactamases de Espectro estendido (Serine-proteases) é tão grande que foi criado até um web site (<http://www.lahey.org/studies>), com o objetivo de tentar manter uma certa ordem no que diz respeito à nomenclatura a ser utilizada nas novas descobertas. Para se caracterizar a descoberta de uma nova ESBL é necessário se descobrir alguma modificação, como mudança na região promotora, sozinha e/ou em conjunto com uma substituição nucleotídica, que funcionalmente devem ser "silenciosas".

### Esquemas de Classificação

A relação fundamental entre as enzimas ESBLs foi melhor refletida pelo esquema de classificação de Ambler, que é baseada na similaridade entre as seqüências de aminoácidos (AMBLER *et al.*, 1991). Outro esquema de classificação utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH K. *et al.*, 1995; BUSH K., 2001).

Segundo o esquema de Ambler, as ESBLs podem ser divididas em 04 classes evolucionárias distintas (A, B, C e D). As Beta-lactamases SHV- e TEM- são pertencentes à classe A, que possuem uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo. Além disso, são penicilinas e cefalosporinas usualmente encontradas em plasmídeos ou transposons. Já as OXA-derivadas são ESBLs pertencentes a classe D (oxacilinas).

O esquema de Bush classifica as ESBLs segundo o perfil do

substrato, características físicas como peso molecular e ponto isoelétrico (BUSH K. *et al.*, 1995; BUSH K., 2001). No esquema funcional de Bush, as ESBLs são divididas em dois sub-grupos: 2be (principalmente TEM- and SHV-) e 2d (OXA-). Em geral, os dois sub-grupos são inibidos pelo clavulanato (BUSH K. *et al.* 1995).

### Classificação Funcional (Fenotípica) das ESBLs, segundo BUSH *et al.*, 1995

Em 1995, Bush-Jacoby-Medeiros apresentaram um novo esquema de classificação, no qual, dividiram as enzimas em 4 grandes grupos (1 - 4) e subgrupos (a - f) (BUSH *et al.*, 1995; BUSH, K., 2001) (Tab. I).

**Tabela I**  
**Características Funcionais e Moleculares das Beta-Lactamases.**

Grupo Funcional	Maior Subgrupo (Bush <i>et al.</i> ) <sup>a</sup>	Classe Molecular (Ambler) <sup>b</sup>	Substrato de Preferência <sup>c</sup>							Inibição			Num. estimado			
			PEN	CARB	OX	CR	CTX	ATM	IPM	CLAV	CLOX	EDTA	1995	2000		
1		C	++	+	-	+++	+	-	-	-	-	++	-	-	32	51
2	2a	A	+++	+	-	±	-	-	-	-	++	-	-	-	20	23
	2b	A	+++	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	-	16	16
	2be	A	+++	+	+	++	++	++	-	++	-	-	-	-	36	119
	2br	A	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	9	24
	2c	A	++	+++	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	15	19
	2d	D	++	+	+++	+	-	-	-	V	-	-	-	-	18	31
2e		A	++	++	-	++	++	++	-	++	-	-	-	-	19	20
	2f	A	++	+	?	++	++	++	+	+	-	-	-	-	3	4
3	3a,3 b, 3c	B	++	++	++	++	++	-	++	-	-	++	-	-	13	24
			++	++	++	V	V	-	-	-	-	-	-	-	7	9

<sup>a</sup> Tabela adaptada de: aBUSH *et al.*, 1995; bLIVERMORE D. M., 1998; cAMBLER R. P., 1980.  
Inibição: ++, forte; +, moderada; V variável; - negativa; CLAV, ácido clavulânico; CLOX, cloxacilina; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético.  
Substrato de preferência: +++, subst. de preferência; ++, bom substrato; +, hidróliza; ± hidrólise mínima; - Não hidróliza; PEN, penicilina; CARB, carbenicilina; OX, oxacilina; CR, cefaloridina; CTX, cefotaxima; ATM, aztreonam; IPM, imipenem.

O grupo 1 é formado por cefalosporinas que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também, pertencentes a classe molecular C. O grupo 2 são penicilinas, cefalosporinas, ou ambas, que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes às classes moleculares A e D. Nesta classe estão as primeiras beta-lactamases isoladas (TEM-1 e SHV-1). Porém, por causa do numeroso aparecimento de ESBLs mutantes, foram criadas duas sub-classes: 2a e 2b. A sub-classe 2a contém apenas penicilinas, enquanto a 2b contém ESBLs de amplo espectro, e com a capacidade de inativação tanto de penicilinas quanto de cefalosporinas na mesma proporção (SHAH *et al.*, 2004). Com o passar dos anos, surgiu a necessidade da criação de novos subgrupos, segregados do subgrupo 2b. Trata-se atualmente dos subgrupos 2be e 2br. No subgrupo 2be, a letra "e" significa amplo espectro de atividade e representa as beta-lactamases capazes de inativar as cefalosporinas de 3ª. geração (ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima). Assim, com os monobactams (aztreonam). No subgrupo 2br, a letra "r" denota a reduzida ligação aos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico e sulbactam); são também conhecidas como ESBLs resistentes aos inibidores de beta-lactamases (derivadas da TEM). Algumas ainda mantêm-se susceptíveis ao tazobactam (SHAH *et al.*, 2004). Existe, ainda, o subgrupo 2c, o qual foi separado do subgrupo 2b, devido a estas enzimas inativarem a carbenicilina, com maior afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a cloxacilina. O subgrupo 2d inativa a cloxacilina com mais afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a carbenicilina, além de serem fracamente inibidas pelos inibidores de beta-lactamases. O subgrupo 2e são cefalosporinas que podem também hidrolisar os monobactams e são inibidas pelo ácido clavulânico.

nico. Além disso, o subgrupo 2f foi adicionado, devido a tratar-se de enzimas classificadas como "*Serina-beta-lactamases*", em contraste as "*Zinco-beta-lactamases*", incluídas no grupo 3.

O grupo 3 são enzimas que possuem no seu sítio ativo a necessidade de Zinco (Zn) para exercerem seu efeito, por isso chamadas de "*Zinco-beta-lactamases*" ou simplesmente "*Metallo-beta-lactamases*", e correspondem à classe molecular B. Finalmente existe o grupo 4, onde localizam-se as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não possuem grupo molecular definido (SHAH *et al.*, 2004).

### Classificação Molecular

A classificação molecular das beta-lactamases é baseada na sequência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas. Nos dias atuais, 04 classes são conhecidas (A a D), e são correlacionadas com suas classificações funcionais. As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas "*Serinas*", enquanto a classe B ou *Metallo-beta-lactamases* necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das *ESBLs* estão contidas na classe molecular "A" de Ambler (AMBLER, R P., 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo "*Serina*" e massa molecular de aproximadamente 29.000 KDa, e preferência (afinidade) de hidrólise sobre as penicilinas (HALL E BARLOW, 2005).

### Característica de susceptibilidade das ESBLs

As *ESBLs* diferem-se entre si (mesma família) por substituições na sequência de aminoácidos (de 1 a 7), os quais alteram configurações e propriedades do seu sítio ativo. As substituições mais importantes são as mutações que conferem amplo espectro a estas enzimas (Ex.: Posição 164 de Ambler nas TEMs, 179 nas SHVs e 238 em ambas), que ampliam seu sítio ativo, o qual produz espaço suficiente para interação entre a enzima e os antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro portadores de grandes cadeias *Oxiamino-*; como resultado, esta modificação faz com que estas enzimas sejam capazes de hidrolisar antibióticos betalactâmicos como a: Cefotaxidima, Cefuroxima e Aztreonam. Em contraste como suas "parentes" próximas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), que reconhecem os antibióticos betalactâmicos de amplo espectro como substrato, muito fracamente (KNOX JR., 1995).

### Fatores de Risco

Alguns estudos têm revelado a existência de vários fatores de risco independentes entre si, associados à produção de *ESBLs*. O principal fator, sem dúvida, está relacionado ao tempo de permanência do paciente nos hospitais, principalmente nos centros de tratamento intensivo (CTIs) (BIS-SON *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002; MENASHE *et al.*, 2001; LUCET *et al.*, 1996); outro fator importante, são casos de hospitalização anterior, onde houve o uso de diversos antimicrobianos para erradicação da infecção, principalmente cefalosporinas de amplo-espectro (KIM *et al.*, 2002; MENASHE *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002; LAUTENBACH *et al.*, 2001; PENA *et al.*, 1997).

Outro importante fator de risco está associado à utilização de procedimentos invasivos, como cateteres venosos centrais, cateteres arteriais, urinários e cateteres utilizados em drenagem biliar (MENASHE *et al.*, 2001; LUCET *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2002; PENA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2002), além de intubações pulmonares, mecanismos de ventilação pulmonar artificial e doenças severas (doenças malignas e falha cardíaca) (MENASHE *et al.*, 2001; PENA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2002; PIROTH *et al.*, 1998).

### Reservatórios Não-Hospitalares

Os microrganismos produtores de *ESBLs* são usualmente encontrados no ambiente hospitalar, conforme mencionado anteriormente, principalmente nas unidades de tratamento intensivo (CTIs). Embora seu aparecimento venha aumentando em ambientes cirúrgicos, pediátricos e neonatais, além dos oncológicos.

Situações inusitadas vêm sendo reportadas com mais frequência nos EUA e na França, a exemplo do aparecimento deste fenômeno em locais até então sem relatos de transmissão de microrganismos produtores de *ESBLs*, como centros de reabilitação (Clínicas de Reabilitação), centros de repouso (Asilos), assim como pacientes ambulatoriais portadores de doenças crônicas que podem ser transmissores de microrganismos produtores de *ESBLs* (BRADFORD *et al.*, 1995; RASMUSSEN *et al.*, 1993; EINHORN *et al.*, 2002).

Algumas vezes, este reservatório não hospitalar pode ser bem grande, como mostra um estudo realizado no Hospital Michel Reese em Chicago, onde 7 das bactérias gram-negativas resistentes à ceftazidima (Cefalosporina de 3ª. Geração) são advindas de pacientes provenientes de casas de repouso e clínicas de reabilitação. E em 80% destes casos, os microrganismos resistentes à ceftazidima foram isolados na primeira cultura realizada no ambiente hospitalar (RASMUSSEN *et al.*, 1993).

### Opções Terapêuticas

Existe a possibilidade de tratamento com cefamicinas, como a cefoxitina, cefotetan e moxalactam, que são geralmente efetivos contra as Enterobacterias produtoras de *ESBLs* (TEM-, SHV- e CTX-M-). Porém, com terapias prolongadas a *Klebsiella pneumoniae*, pode adquirir resistência a cefamicinas (PANGON *et al.*, 1989; MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1996).

Os aminoglicosídeos também podem ser utilizados se a cepa estudada for susceptível. Porém, devido aos genes que codificam as *ESBL*, serem transmitidos via plasmídeos, existe a possibilidade de transmissão cepa-a-cepa, fator que pode levar rapidamente a transmissão de resistência a esta classe de fármaco. Já que a maioria dos microrganismos produtores de *ESBLs* serem também resistentes aos aminoglicosídeos, principalmente à gentamicina (OTEO *et al.*, 2002).

A utilização de Beta-lactâmicos em associação com inibidores de beta-lactamases, inicialmente, foi considerado o tratamento de escolha, embora não se demorou muito para verificar-se sua ineficácia *in vivo* (FRENCH *et al.*, 1996). Inicialmente, foi verificado que estes fármacos estão também sujeitos ao aumento da concentração inibitória mínima (CIM), com o aumento do inóculo bacteriano (CARON *et al.*, 1990), além disso, pode haver perda de porinas na membrana externa bacteriana, o que leva também à redução na atividade inibitória destes fármacos (RICE *et al.*, 1993). Além do mais, verificou-se que o sulbactam e o tazobactam não possuem bons efeitos contra *ESBLs* codificadas pelos genes SHV- (JACOBY e CARRERAS, 1990; BAUER-NFEIND, 1998).

Outra opção seria a utilização de fluoroquinolonas, já que inicialmente achava-se que a sua resistência era somente codificada por via cromossomal. Novamente, esbarrou-se na característica da maioria das bactérias produtoras de *ESBLs*, possuir este cromossomo (PATERSON *et al.*, 2000). Além do mais, alguns estudos vêm demonstrando que esta resistência também pode ser transferida via plasmídeos (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998).

As cefalosporinas de 4ª. geração demonstram alta capacidade de destruir estes microrganismos *in vitro*. Relatos de-

monstram níveis como 95-100% de atividade contra este tipo de microorganismo (JOHNSON *et al.*, 1999; BIEDENBACH *et al.*, 1999; TALLIS *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 1998). Embora estes fármacos demonstrem o mesmo problema apresentado pelas outras cefalosporinas (aumento da CIM, conforme aumento de inóculo). Um exemplo deste efeito pode ser visualizado em modelos de infecção em ratos (SZABO *et al.*, 2001). Atualmente, o cefepime não é considerado fármaco de primeira escolha para infecções causadas por microorganismos produtores de *ESBLs*. Mesmo quando em combinação com a amicacina ou outro aminoglicosídeo, pois este uso ainda necessita de mais estudos clínicos antes de ser recomendado como tratamento de escolha.

Finalmente, temos os carbepens (Imipenem, Meropenem) que possuem ação uniforme contra este tipo de microorganismo, seja *in vitro* ou *in vivo* (BELL *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 1998). Além disso, os carbepens são altamente estáveis à atividade hidrolítica das *ESBLs*, sem contar sua ótima penetração através da membrana externa, principalmente devido a seu peso molecular compacto e sua forma estrutural muito peculiar. Mecanismos de resistência a estes fármacos já vêm sendo detectados, tais como perda de proteínas na membrana externa (MACKENZIE *et al.*, 1997); resistências específicas contra *ESBLs* codificadas por TEM-, SHV- e AmpC- foram descritas como resultado da perda de porinas (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1999). A aquisição de carbepenases, enzimas capazes de degradar os carbepens, também vêm sendo descritas por inúmeros centros de pesquisa distribuídos pelo mundo (LIVERMORE, 1997).

### Medidas de Controle

#### Modos de Transmissão

A ampla e rápida distribuição geográfica das *ESBLs* é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro estão se deparando desde do início dos anos 80. As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal das cepas produtoras de *ESBLs* (FRENCH *et al.*, 1996; PALUCHA *et al.*, 1999; PENA *et al.*, 1998) ou a disseminação através de genes produtores de *ESBLs* carreados por plasmídeos que são transmitidos entre gêneros diferentes de Enterobactérias (KITZIS *et al.*, 1988; RICE *et al.*, 1990). Ambas, a disseminação por plasmídeos ou a própria multiplicação bacteriana, podem ocorrer concomitantemente (PALUCHA *et al.*, 1999; NEUWIRTH *et al.*, 1996; VENEZIA *et al.*, 1995). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o mesmo gene codificador tem sido encontrado em diferentes plasmídeos presentes em diferentes cepas. Finalmente, já se sabe que alguns genes codificadores de *ESBLs* são residentes em *transposons* ou em *integrans*, fornecendo assim os meios adicionais para sua propagação e expressão (NAAS *et al.*, 2001; POIREL *et al.*, 1999 e 2000).

#### Riscos de Transmissão

A transmissão das *ESBLs* no ambiente hospitalar é muito complexa e envolve diversas variáveis. Algumas vezes pacientes provindos de ambientes externos, como casas de repouso ou outras instituições (ex.: Clínicas de Reabilitação), podem ser carreadores e transmissores iniciais de cepas produtoras de *ESBLs*, quando admitidos no ambiente hospitalar (BRADFORD *et al.*, 1995; RASMUSSEN *et al.*, 1993; EINHORN *et al.*, 2002). Embora a transmissão mais citada na bibliografia seja a que acontece no ambiente hospitalar, favorecida pela pressão seletiva de antibióticos que, como resultado, podem favorecer a transmissão interpessoal entre os profissionais de saúde, que manipulam o

paciente colonizado, e acabam transmitindo o microorganismo a outros pacientes até então não infectados (EINHORN *et al.*, 2002).

#### Isolamento e precauções no contato com pacientes

O isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados com bactérias produtoras de *ESBLs* são pontos cruciais no controle da disseminação de tais microorganismos no ambiente hospitalar (FRENCH *et al.*, 1996; SHANNON *et al.*, 1998). Atualmente, já existem alguns documentos citando medidas a serem tomadas quanto à manipulação de tais pacientes (Guia do CDC) (GARNER, 1996).

Além da separação física dos pacientes infectados ou colonizados por bactérias produtoras de *ESBLs*, deve-se tomar alguns cuidados durante o contato com estes pacientes, tais como: atenção cuidadosa na anti-sepsia (ex.: uso de clorexidina), além da utilização de vestimenta específica com objetivo de proteção individual (GARNER, 1996).

### IDENTIFICAÇÃO DE BETA-LACTAMASES (*ESBLs*) NO LABORATÓRIO DE ROTINA (Análises Clínicas)

#### Identificação inicial de bactérias produtoras de *ESBLs* – (Classe Molecular A e D, de Ambler)

Para a identificação inicial de bactéria produtoras de *ESBLs* deve-se utilizar a metodologia proposta pelo NCCLS (*National Committee of Clinical Laboratory Standards*), no documento M100-S14 de janeiro de 2004, que utiliza antibióticos “marcadores” da possível presença de *ESBLs*. Os antimicrobianos preconizados pelo NCCLS como marcadores para triagem de *ESBLs* e os pontos de corte para o método de difusão do disco estão descritos na tabela 2 (Tab. II).

**Tabela II**  
Critério de “Screening” sugerido pelo NCCLS, para evidênciação de *ESBLs*

Agente Antimicrobiano	Halo de difusão do disco (mm)
Cefpodoxima	≤ 17
Ceftazidima	≤ 22
Aztreonam	≤ 27
Cefotaxima	≤ 27
Ceftriaxona	≤ 25
Resultado	= Pode indicar a produção de <i>ESBL</i> , necessita confirmação.

\* Esta tabela foi adaptada do documento M100-S14 (NCCLS, 2004).

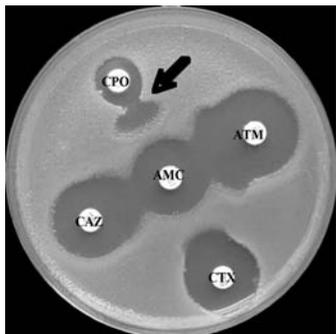
Esta primeira triagem pode ser feita durante a realização do antibiograma de rotina, tomando-se cuidado de incluir os antibióticos “marcadores”. Qualquer halo menor que o descrito na tabela 2 é indicativo da produção de beta-lactamases de espectro estendido (*ESBLs*).

Para confirmação deste fenômeno o NCCLS indica duas metodologias. A primeira é a verificação através da metodologia do *E-teste*®, o qual tornou-se praticamente inviável para uso em laboratório de rotina, devido principalmente ao seu alto custo. A segunda metodologia pode ser incorporada durante a realização do antibiograma (Aproximação do disco).

#### Confirmação da produção de *ESBLs* (Classe Molecular A e D, de Ambler), através da metodologia de Aproximação do Disco

Também conhecido como “*Double-disc synergism*”, neste teste utiliza-se no centro de uma placa (150 mm) de ágar Muller-Hinton, previamente inoculada com a cepa a ser es-

tudada ajustada para a escala 0.5 de Mac Farland ( $10^8$  UFC/mL) e coloca-se no centro do ágar um disco de amoxicilina/ácido clavulânico e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores (Cefoxitina, Aztreonam, Ceftazidima e Cefoxitina) na distância de 20 a 30 mm de centro a centro, em relação ao disco central (Fig. 1).



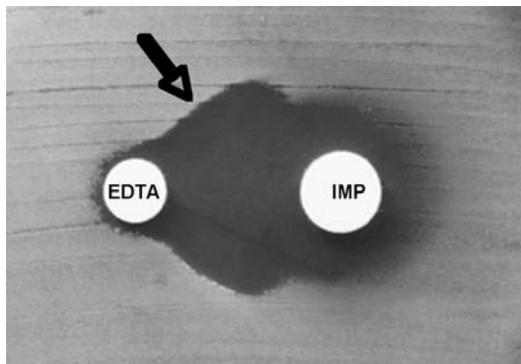
**Figura 1 – Exemplificação da metodologia de Aproximação do Disco (Classe A e D de Ambler) (NCCLS, 2004).**

\* *Escherichia coli* produtora da ESBL. AMC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CTX = Cefotaxima; ATM = Aztreonam; CAZ = Ceftazidima; CPO = Cefpodoxima. A seta negra, demonstra o aparecimento do fenômeno conhecido como Zona Fantasma "Ghost Zone", que caracteriza a produção de ESBL pela cepa bacteriana isolada.

Após incubação por 18 a 20 horas de 33 a 35°C, deve ser procedida a leitura dos halos. A formação de uma zona fantasma "Ghost Zone" entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico é positiva para presença de ESBL (NCCLS, 2004). Este teste pode ser incorporado durante o Antibiograma de rotina, apenas tomando cuidado de colocar-se os antibióticos marcadores perto do disco de amoxicilina/ácido clavulânico, com o objetivo de verificar a possível produção da Zona Fantasma.

#### Identificação inicial de bactérias produtoras de Metallo-beta-lactamases - (Classe Molecular B, de Ambler)

A produção destas enzimas pode ser visualizada pela metodologia da aproximação do disco modificado (ARAKAWA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001; YONG *et al.*, 2002). Neste teste, utiliza-se os discos de imipenem, meropenem e/ou ceftazidima estrategicamente alinhados ao redor de um disco de papel impregnado com 750 µg de EDTA. O aparecimento de uma zona de confluência entre os carbepens e/ou a ceftazidima e o disco contendo EDTA (inibidor de Metallo-Beta-Lactamases) é considerado positivo para a presença de Metallo-beta-lactamases (Fig. 2).



**Figura 2 – Demonstração da detecção de Metallo-Beta-Lactamases (Classe B de Ambler), através da difusão do disco modificada.**

\* EDTA = Ácido etilendiaminotetracético; IMP = Imipenem. O aumento na zona de inibição em torno do disco de Imipenem, demonstra a ação inibitória do EDTA sobre a enzima produzida (Metallo-Beta-Lactamase) pela cepa bacteriana. A seta negra, demonstra o local onde ocorreu aumento da sensibilidade, devido a ação do EDTA.

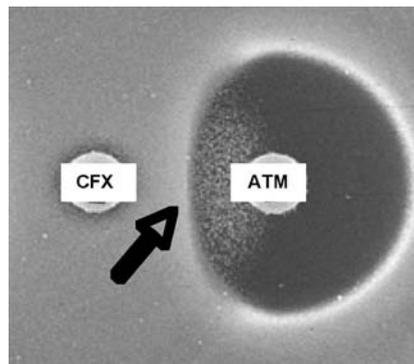
#### Identificação de bactérias produtoras de AmpC (ESBLs) – (Classe Molecular C, de Ambler)

Também, conhecidas como Beta-lactamases cromossomais induzidas, as ESBLs (AmpC), constituem um grupo de enzimas com características particulares. Entre estas características podemos destacar a resistência aos inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (THOMSON e SMITH MOLAND, 2000).

Em algumas espécies este fenômeno é constitutivo, tais como: *Citrobacter freudii*, *Morganella morgani*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Desta maneira, uma vez feita a identificação da espécie, o laboratório deve informar que estas são capazes de produzir beta-lactamases cromossomais induzíveis, e podem desenvolver resistência as cefalosporinas de 3ª geração durante o tratamento com estes antimicrobianos ou com outros indutores, como a cefoxitina (PITOUT *et al.*, 2003).

Para a detecção da produção destas enzimas em outras bactérias, que não apresentam este fenômeno constitutivamente, a melhor maneira seria visualizar a resistência às cefamicinas, como a cefoxitina, pois trata-se do melhor indutor deste fenômeno (BAUERNFEIND *et al.*, 1998). Embora, muitas vezes, isto não seja possível, devido à necessidade do contato prévio com indutor, o que dificulta sua detecção. (YAN *et al.*, 2002).

Por isso, a melhor maneira de observar este fenômeno a nível fenotípico, é através da metodologia da aproximação do disco, modificada (YAN *et al.*, 2002; YONG *et al.*, 2005). Nesta metodologia, coloca-se um disco de cefoxitina, próximo a um disco de Aztreonam ou outro beta-lactâmico (15 mm de centro a centro), e o aparecimento de uma zona de entroncamento "Truncada", entre os dois discos é presuntivo da presença de ESBL, da classe C de Ambler (Fig. 3).



**Figura 3 – Detecção de Beta-Lactamase do grupo C de Ambler (Induzida).**

\* CFX = Cefoxitina, antibiótico da classe das cefalosporinas (Cefamicina), que é forte indutora da produção de Beta-Lactamases do grupo C; ATM = Aztreonam, fármaco beta-lactâmico, o qual, inicialmente a bactéria se mostrava sensível. A seta negra, demonstra a zona onde ocorreu diminuição na sensibilidade (Zona Truncada), causada pela exposição da bactéria ao antibiótico cefoxitina (indutora).

#### CONCLUSÃO

O aumento "explosão" no aparecimento das beta-lactamases de espectro-estendido, observada nos últimos anos, é devida em grande parte, à pressão seletiva sofrida pela utilização indiscriminada de cefalosporinas de 2ª e 3ª gerações. Parece inevitável que as ameaças mais importantes aos clínicos, neste milênio, será o encontro freqüente com patógenos que produzem Beta-lactamases múltiplas e potentes, incluindo as mediadas por plasmídeos tais como

*ESBLs*, AmpCs, e as *Metallo-Beta-Lactamases*. Além disso, a inabilidade de muitos laboratórios de microbiologia clínica em fornecer a informação oportuna e exata sobre a ocorrência de tais enzimas facilitará sua propagação. Se a pressão da seleção continuar e controle destas infecções forem ineficazes, a propagação da resistência continuará a se espalhar e haverá mais organismos que são totalmente resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Para evitar isto, será necessário mudar os comportamentos atuais como o diagnóstico e a terapêutica. A prioridade principal deveria ser o incentivo financeiro aos laboratórios clínicos, por parte do governo, com objetivo de atualizar sua equipe técnica e equipamentos necessários para se detectar estas enzimas, além de outros mecanismos de resistência emergentes.

## REFERÊNCIAS

1. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 1991 May 15;276 ( Pt 1):269-70.
2. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289 (1036):321-31.
3. Arakawa Y, Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagui T., Fujiwara H., Goto M. Convenient test for screening metal-beta-lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000 38(1): 40-43.
4. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J*. 1998 Dec;39(6):520-5.
5. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN; Sentry APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;42(3):193-8.
6. Biedenbach DJ, Lewis MT, Jones RN. In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum beta-lactams for isolates in Malaysia and Singapore medical centers. The Malaysia/Singapore Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999 Dec;35(4):277-83.
7. Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH, Lautenbach E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 May;23(5):254-60.
8. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Apr;39(4):899-905.
9. Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Rossolini GM, Amicosante G, Toniolo A. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Feb;25(2):157-62.
10. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 1;32(7):1085-9. Epub 2001 Mar 21.
11. Bush LM, Calmon J, Johnson CC. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. *Infect Dis Clin North Am*. 1995 Sep;9(3):653-86.
12. Caron F, Gutmann L, Bure A, Pangon B, Vallois JM, Pechinot A, Carbon C. Ceftriaxone-sulbactam combination in rabbit endocarditis caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-broad-spectrum TEM-3 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Nov;34(11):2070-4.
13. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacotherapy*. 2002 Jan;22(1):14-20.
14. French GL, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb;34(2):358-63.
15. Gales AC, Sader HS, Jones RN; SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Nov;44(3):289-99
16. Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. Part I. Evolution of isolation practices, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control*. 1996 Feb;24(1):24-31.
17. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):1050-1. Epub 2005 May 4.
18. Ho PL, Chan WM, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(8):567-73.
19. Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 May;34(5):858-62.
20. Johnson DM, Biedenbach DJ, Jones RN. In vitro evaluation of broad-spectrum beta-lactams in the Philippines medical centers: role of fourth-generation cephalosporins. The Philippines Antimicrobial Resistance Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999 Dec;35(4):291-7.
21. Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, Erwin ME, Hollis RJ. Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum beta-lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States. Cefepime Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Mar;30(3):215-28.
22. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, Kim EC. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 May;46(5):1481-91.
23. Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein FW, Williamson R, Tran Van Nhieue G, Carlet J, Acar JF, Gutmann L. Dissemination of the novel plasmid-mediated beta-lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Jan;32(1):9-14.
24. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.
25. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Dec;39(12):2593-601.
26. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 15;32(8):1162-71. Epub 2001 Mar 26.
27. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH., Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb; 7(2):88-91.
28. Livermore DM. Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Jun;39(6):673-6.
29. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct;8(4):557-84.
30. Lucet JC, Chevret S, Decre D, Vanjak D, Macrez A, Bedos JP, Wolff M, Regnier B. Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis*. 1996 Mar;22(3):430-6.
31. MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SG, Gould IM. Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*. 1997 Sep 13;350(9080):783.
32. Martinez-Martinez L, Garcia I, Ballesta S, Benedi VJ, Hernandez-Alles S, Pascual A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul;42(7):1850-2.
33. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Feb;40(2):342-8.
34. Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Diaz D, Suarez AI, Tran J, Benedi VJ, Jacoby GA. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1669-73.
35. Mathai D, Jones RN, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 Jul;40(3):129-36.
36. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 1997 Jan;24 Suppl 1:S19-45.
37. Menashe G, Borer A, Yagupsky P, Peled N, Gilad J, Fraser D, Riesenber K, Schlaeffer F. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bacteremia. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(3):188-93.
38. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. Characterization of In53, a

- class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol.* 2001 Jan;183(1):235-49.
39. NCCLS – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement. M100-S14. Wayne, Pa. NCCLS, 2004.
  40. Neuwirth C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):76-9.
  41. Oplustil, C.P. *et al.*, *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.* 2ª. Ed., São Paulo, Sarvier, 2004.
  42. Oteo J, Campos J, Baquero F; Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):945-52.
  43. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Oct;44(4):489-99.
  44. Pangon B, Bizet C, Bure A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, Gutmann L. In vivo selection of a cephalosporin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. *J Infect Dis.* 1989 May;159(5):1005-6.
  45. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2000 Mar;30(3):473-8.
  46. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jan;42(1):53-8.
  47. Pena C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Linares J, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1997 Jan;35(1):9-16.
  48. Piroth L, Aube H, Doise JM, Vincent-Martin M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis.* 1998 Jul;27(1):76-80.
  49. Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3933-5.
  50. Poirel L, Guibert M, Girlich D, Naas T, Nordmann P. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):769-76.
  51. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Apr;44(4):891-7.
  52. Rahman MM, Haq JA, Hossain MA, Sultana R, Islam F, Islam AH. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Nov;24(5):508-10.
  53. Rasmussen BA, Bradford PA, Quinn JP, Wiener J, Weinstein RA, Bush K. Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 beta-lactamases encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Sep;37(9):1989-92.
  54. Rice LB, Carias LL, Etter L, Shlaes DM. Resistance to cefoperazone-sulbactam in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for enhanced resistance resulting from the coexistence of two different resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):1061-4.
  55. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Jacoby GA. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Nov;34(11):2193-9.
  56. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001 Aug;5(4):200-14. Epub 2003 Mar 7.
  57. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ; SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Nov;44(3):273-80.
  58. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras JM, Sanders WE Jr. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify beta-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38 (2):570-4.
  59. Sanders CC, Sanders WE Jr. beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 1992 Nov;15(5):824-39.
  60. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydná E, Landman D. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jun;45(6):895-8.
  61. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol.* 2004;30(1):25-32.
  62. Shannon K, Fung K, Stapleton P, Anthony R, Power E, French G. A hospital outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. *J Hosp Infect.* 1998 Aug;39(4):291-300.
  63. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987 Sep;20(3):323-34.
  64. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):879-84.
  65. Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Sep;38(1):59-67.
  66. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect.* 2003 Nov;47(4):273-95.
  67. Sturenburg E, Sobottka I, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Jan;51(1):51-5.
  68. Szabo D, Mathe A, Filetoth Z, Anderlik P, Rokusz L, Rozgonyi F. In vitro and in vivo activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1287-91.
  69. Tallis E, Rudensky B, Attias D, Raveh D, Schlesinger Y, Yinnon AM. In-vitro activity of cefepime and other broad-spectrum antimicrobials against several groups of gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999 Oct;35(2):121-6.
  70. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1225-35.
  71. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 1995 Oct;21(4):915-23.
  72. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32 Suppl 2:S94-103.
  73. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9): 3121-6.
  74. Yong D, Lim Y, Song W, Choi YS, Park DY, Lee H, Yum JH, Lee K, Kim JM, Chong Y. Plasmid-mediated, inducible AmpC beta-lactamase (DHA-1)-producing Enterobacteriaceae at a Korean hospital: wide dissemination in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* and emergence in *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Jun 1.
  75. Yong D., Lee K., Yum JH., Shin HB., Rossolin GM., Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002 40(1): 3798-3801.

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Eduardo Monguilhott Dalmarco - eduardodal@furb.br  
Departamento de Ciências Farmacéuticas, CCS – FURB,  
CAMPUS III, Itoupava Seca - Rua Iguçu, 2171 – CEP. 89030-000  
Blumenau - SC