

Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases

Mechanisms of resistance and detection of beta-lactamases

Maria de Lourdes de Almeida P. Macedo*
 Rafaella de Sousa Cartaxo*
 Tatiana Carneiro da Cunha Almeida*
 Luciana Barreto S. de Souza**
 Willma José Santana**
 Henrique Douglas Melo Coutinho***

* Discente da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ).
 e-mail: <paulamen@dilk.com.br>

** Mestre em Microbiologia. Docente da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ).

*** Mestre em Genética. Docente da Universidade Regional do Cariri (URCA) e da FMJ.
 e-mail: <hdouglas@zipmail.com.br>
 <h-douglas@bol.com.br>

Resumo

Muitos mecanismos de resistência de bactérias estão envolvidos para sua proteção contra os efeitos letais dos antibióticos beta-lactâmicos. No entanto, o mais importante é a produção de beta-lactamases, as quais se caracterizam por serem enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico. Entre estas enzimas, destacamos a produção de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL), principalmente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas. O aumento da prevalência de bactérias produtoras de beta-lactamases criou a necessidade de métodos que identifiquem a presença destas enzimas no microorganismo isolado.

Palavras-chave: Resistência. Beta-lactamase. Antibióticos. ESBL.

Abstract

Many resistance mechanisms are involved to protection of bacteria against the effects of the beta lactamic antibiotics. However, the most important one is the production of beta-lactamases, a group of enzymes that catalyze the hydrolyse of the beta lactamic ring. Among these enzymes, we detached the production of extended – spectrum beta-lactamases (ESBL), mainly in some species of Gram-negative bacteria. The increase of the prevalence of beta-lactamases produced by bacteria show the necessity of methods to identify these enzymes in isolated microorganisms.

Key words: Resistance. Beta-lactamases. Antibiotics. ESBL.

1 Introdução

O surgimento de bactérias multiresistentes a drogas é um fenômeno que une clínicos e indústria farmacêutica, visto que esse problema é uma das maiores causas de falha no tratamento de doenças infecciosas (HIRAKATA et al., 1998).

Diversos mecanismos emergentes de resistência aos antimicrobianos foram recentemente descritos e alguns deles são de difícil detecção pela metodologia laboratorial empregada na rotina. Embora exista uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, o mecanismo mais importante é a produção de beta-lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana (CHOQUE, 1993).

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos beta-lactâmicos. A primeira beta-lactamase foi identificada em *Escherichia coli*, durante estudos para a utilização de penicilina na prática médica. O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana). A produção de beta-lactamases também é responsável pela resistência a alguns beta-lactâmicos,

como penicilina G e ampicilina, em bactérias Gram-positivas (BRADFORD, 2001).

O termo Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) refere-se às beta-lactamases que apresentam resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro, os quais normalmente possuem atividade contra os bacilos Gram-negativos. A maioria das ESBLs contém serina nos seus sítios ativos e pertence à classe A de beta-lactamases. As bactérias produtoras dessas enzimas representam um grande desafio tanto para sua detecção laboratorial, quanto para o tratamento adequado das infecções por elas causadas. Isso é decorrente de vários fatores, incluindo a grande variedade de tipos de ESBL e das variações potência e afinidade destas aos diferentes beta-lactâmicos (EMERY; WEYMOUTH, 1997; BRADFORD, 2001).

O surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é inevitável para a conservação das espécies, mas o controle na utilização dos mesmos pode limitar o aparecimento de cepas multiresistentes (BLATT, 2003).

2 Ação dos Antibióticos Beta-lactâmicos e o Mecanismo de Resistência das Bactérias

Os beta-lactâmicos se caracterizam por apresentar um anel beta-lactâmico essencial para a sua atividade antibacteriana. São antibióticos bactericidas, que

inibem a síntese da parede celular através da interrupção do processo de transpeptidação. Esse mecanismo baseia-se na união de beta-lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície interior da membrana celular bacteriana, denominados "proteínas receptoras de penicilina" (PBPs). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese de peptidoglicano, estas proteínas catalisam a ligação cruzada das subunidades da parede celular. Para a sua atuação, os beta-lactâmicos devem primeiramente penetrar na parede celular bacteriana. A camada glicopeptídica das bactérias Gram-positivas é espessa e externa a uma membrana celular única, enquanto a camada glicopeptídica das bactérias Gram-negativas, que é muito mais delgada, encontra-se entre a membrana plasmática e membrana celular externa. Sendo assim, os beta-lactâmicos podem atuar mais facilmente nas bactérias Gram-positivas (KONEMAN et al., 2001).

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos beta-lactâmicos através de três mecanismos: (1) prevenção da interação entre o antibiótico e a PLP alvo, (2) incapacidade do antibiótico de se ligar à PLP e (3) hidrólise do antibiótico por beta-lactamase. Existem vários tipos de beta-lactamases, que são classificadas pela sua seqüência de aminoácidos e substratos correspondentes produzidos (STAPLETON et al., 1999).

A atividade das beta-lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias aos antibióticos beta-lactâmicos. A síntese dessas enzimas é induzida tanto pela presença de antibiótico beta-lactâmico quanto pela de precursores da parede celular do meio extracelular (NAGANO et al., 1999).

A atividade dessas enzimas está dirigida especificamente à hidrólise de um anel beta-lactâmico, provocando a produção de um composto ácido desprovido de atividade antibacteriana. O uso de uma importante quantidade de novos antibióticos beta-lactâmicos contribui, através de várias décadas, a uma seleção de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que produzem essas enzimas (ZEMELMAN et al., 2002).

As beta-lactamases são divididas em quatro classes: A, B, C e D, baseadas em suas estruturas e substratos específicos. Além disso, são subdivididas em diversos grupos, como as TEM e SHV ESBLs, comuns em diversas espécies de enterobactérias (NORDMANN, 1998); as carbapenemases (como NMC-A e KPC -1), que podem ser encontradas em *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens* (NORDMANN; POIREL, 2002); as oxacilinases do tipo OXA, presentes em algumas linhagens resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (NAAS; NORDMANN, 1999), entre outras. Isso demonstra a diversidade deste grupo de enzimas, que apresenta mais de 170 tipos diferentes. Dessa maneira, esquemas de classificação de um grupo tão diverso são difíceis de aplicar na prática. Uma tentativa de classificação funcional foi tentada por Karen Bush em vários trabalhos (BUSH, 1989 a,b,c; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Entretanto, fica evidenciado que, apesar dos esquemas propostos serem muito completos

e aceitáveis, ainda é necessário muito avanço para que seja utilizado um sistema único de classificação prático e eficaz.

O grupo mais importante é a classe A, formada por serino-proteases, as quais têm afinidade pela penicilina ou atividade de amplo espectro (como as beta-lactamases TEM-1 e SHV-1). São encontradas nos cromossomos ou em plasmídeos e, portanto, são transferíveis de uma célula a outra com facilidade. Podem ser constitutivas ou indutivas. Nesse grupo, encontram-se as enzimas estafilocócicas e muitas das beta-lactamases mais importantes das bactérias Gram-negativas. As enzimas da classe C atuam principalmente sobre a cefalosporina e podem ser constitutivas ou indutivas, com seus genes sendo encontrados no cromossomo de bactérias Gram-negativas. As enzimas de classe B (metalo enzimas) e D (oxacilinases) têm menor importância clínica (DELAIRE at al., 1992; MAJIDUDDIN; PALZKILL, 2005).

As beta-lactamases das bactérias Gram-positivas, representadas, sobretudo por estafilococos, são em sua maioria enzimas indutivas da classe A, formadas na membrana celular, mas que também são secretadas extracelularmente (KONEMAN et al, 2001).

As beta-lactamases Gram-negativas são mais complexas. A maioria das enterobactérias contém enzimas cromossômicas constitutivas produzidas em baixas quantidades e variáveis segundo a espécie. A indução de altos níveis dessas enzimas cromossômicas da classe C, sobretudo cefalosporinases, aumenta o nível de resistência e expande a cobertura eficaz das enzimas para outras que são resistentes à ação dos beta-lactâmicos, como as cefalosporinas de terceira geração (cefazidima, cafotaxima, etc.) e os carbapenemos (KONEMAN et al, 2001).

Entre essas enzimas, destacamos a produção de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) principalmente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas. Estas enzimas hidrolisam penicilina, cefalosporina e aztreonam. As ESBLs são encontradas mais freqüentemente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas, principalmente em amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Trata-se de potente enzima mediada por genes localizados em plasmídeos e, portanto, com maior facilidade de se disseminar rapidamente para outras enterobactérias como, por exemplo, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp, *Salmonella* spp e outras (MOLAND et al., 2002).

A prevalência da produção de ESBL entre os bacilos Gram-negativos varia nos diversos países e também dentro de cada localização geográfica, possivelmente devido ao uso maior ou menor, ou mesmo indiscriminado, de determinados antimicrobianos. Estas enzimas são usualmente originadas por mutação nos genes TEM-1 e SHV-1 nos plasmídeos e são facilmente transmitidas de um organismo para outro (EMERY; WEYMOUTH, 1997; RUDGERS; HUANG; PALZKILL, 2001).

Os inibidores de beta-lactamases são compostos similares aos antibióticos que se ligam às beta-lactamases, de forma geralmente irreversível, protegendo

os antibióticos contra sua destruição. Os inibidores dessa atividade de aplicação em medicina clínica são o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Os três são eficazes contra penicilinas estafilocócicas e possuem eficácia variável contra enzimas cromossômicas das bactérias Gram-negativas. O clavulanato e o tazobactam são superiores ao sulbactam quanto à atividade contra as beta-lactamases transmitidas por plasmídeos de microrganismos Gram-negativos, incluindo as beta-lactamases de amplo espectro. As ESBLs nem sempre conferem resistência aos inibidores de beta-lactamases como o clavulanato e o tazobactam (STAPLETON; SHANNON; FRENCH, 1999).

A proteína inibidora de beta-lactamase (BLIP) de *Streptomyces clavuligerus* é um potente inibidor de muitas beta-lactamases, incluindo a enzima TEM-1 (PETROSINO et al., 1999).

3 Detecção de Beta-lactamases

O aumento da prevalência de bactérias produtoras de beta-lactamases criou a necessidade de métodos que identifiquem a presença dessas enzimas no microorganismo isolado, condição importante para o tratamento do paciente, porque permite ao médico selecionar o antibiótico adequado evitando medicamentos ineficazes e de alto custo. Os custos dos tratamentos com antimicrobianos respondem por 20% a 60% dos gastos com aquisição de medicamentos da maioria dos hospitais (MOLAND et al., 2002).

Os principais testes diretos disponíveis comercialmente para detecção de beta-lactamases podem ser divididos em três grupos: testes cromogênicos, testes acidimétricos e testes iodométricos (REIS et al., 2001).

Os testes mais utilizados são os cromogênicos que detectam a capacidade da beta-lactamase hidrolisar o anel beta-lactâmico através de uma cefalosporina cromogênica (cefalosporina colorida), ocorrendo uma mudança de cor quando houver ruptura do anel beta-lactâmico. São mais rápidos, convenientes e apresentam performance satisfatória para a detecção da produção de beta-lactamases por vários microrganismos tais como *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacterioides spp.* (HSIUNG et al., 2000; REIS et al., 2001).

Os testes citados acima não se prestam à detecção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), pois resultados positivos não significam que a enzima produzida seja uma ESBL. A grande dificuldade na detecção de cepas produtoras de ESBL é decorrente de vários fatores, como a grande variedade nos tipos de ESBL e as alterações de potência e afinidade destas aos diferentes beta-lactâmicos. A variação tanto no espectro dessa β -lactamases quanto na velocidade com que elas degradam os diferentes β -lactâmicos faz com que a padronização de um teste de sensibilidade para detecção de cepas produtoras de ESBL seja muito difícil (REIS et al., 1998; RANDEGGER et al., 2001). Além disso, os patógenos que produzem estas enzimas nem

sempre apresentam resistência *in vitro* às substâncias antibióticas ou seus fenótipos podem lembrar associação com outros mecanismos de resistência (MOLAND et al., 2002).

Muitos métodos de detecção de ESBLs em isolados clínicos têm sido sugeridos. Todos apresentam mérito, mas nenhum deles é capaz de detectar todas as ESBLs encontradas. 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 ESBLs. (LLANES et al., 2003).

Outro teste utilizado é a adição a discos antimicrobianos de ácido clavulânico, molécula que contém um anel beta-lactâmico e atua como um "inibidor suicida", ligando-se às beta-lactamases e impedindo a destruição dos beta-lactâmicos pelas enzimas. A amostra deve ser considerada produtora de ESBL quando ocorrer um aumento ≥ 5 mm nos halos dos antimicrobianos acrescidos de ácido clavulânico em comparação com os halos dos antimicrobianos sozinhos (SANTOS FILHO et al., 2002; SANTOS et al., 2003). Este é o teste padrão do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS) dos Estados Unidos, órgão responsável pela provação e pelo teste dos métodos empregados na avaliação de amostras de qualquer origem.

Algumas bactérias Gram-negativas apresentam a capacidade de produzir metalo-beta-lactamases (MBLs), enzimas cromossômicas e zinco dependentes com atividade sobre vários beta-lactâmicos e ainda sobre inibidores de beta-lactâmicos. A análise por reação de polimerase em cadeia (PCR) é a técnica mais adequada e satisfatória para a confirmação de amostras MBL-positivas, mas seu uso prático tem sido limitado em virtude do elevado custo. Essas enzimas são inibidas por EDTA ou p-cloromercurilbenzoato (pCMB) e não por inibidores de beta-lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (SPELDOOREN et al., 1998). Podem ser encontradas em patógenos pouco usuais, como a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium spp.*, *Legionella gormanii* e *Bacillus cereus* (SANTOS FILHO et al., 2002; SANTOS et al., 2003).

Arakawa et al. (2000) testaram vários produtos químicos inibidores das metalo-beta-lactamases, estabelecendo um método conveniente de difusão com duplo disco para triagem de bactérias produtoras de MBL, através do uso do ácido 2-mercapto propiônico (2-MPA). A utilidade desse método, no entanto, é limitada devido à alta volatilidade do 2-MPA (SANTOS FILHO et al., 2002).

Outro teste proposto é a utilização de mercaptoacetato de sódio (SMA), composto estável que apresenta um forte efeito inibitório nas MBLs. Este método apresenta a característica de ter alta reprodutibilidade, facilidade de execução e baixo custo, tendo ainda a vantagem de ser um composto estável, com validade prolongada à temperatura ambiente e com baixa ação bactericida (SANTOS FILHO et al., 2002; SASTRE; CARDONA, 2000).

4 Conclusão

Além dos testes de sensibilidade convencionais, é necessária a utilização de testes confirmatórios, os quais possam ser utilizados para detecção de novas beta-lactamases. Além disso, os laboratórios devem ser capazes de detectar, da forma mais rápida e precisa possível, os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos que se expressam ou não em determinados grupos de bactérias, de forma a tornar a antibioticoterapia baseada nessas drogas mais eficiente e segura, seja através de métodos tradicionais ou não (BLATT, 2003).

Referências

ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, n. 1, p. 40-43, Jan. 2000.

BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. *NewsLab*, São Paulo, n. 40, p. 86-97, 2003.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 14, n. 4, p. 933-951, Oct. 2001.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 33, n. 3, p. 259-263, Mar. 1989a.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 33, n. 3, p. 264-270, Mar. 1989b.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 33, n. 3, p. 271-276, Mar. 1989c.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, Jun. 1995.

CHOQUE, R. C. Antibióticos betalactâmicos. *Rev. Soc. Boliv. Med. Famil*, La Paz, v. 3, n. 1, p. 91-97, 1993.

DELAIRE, M. et al. Site-directed mutagenesis at the active site of Escherichia coli TEM-1 beta-lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, n. 29, p. 20600-20606, Oct. 1992.

EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 35, n. 8, p. 2061-2067, Aug. 1997.

HIRAKATA, Y. et al. Rapid Detection and Evaluation of Clinical Characteristics of Emerging Multiple-Drug-Resistant Gram-Negative Rods Carrying the Metallo-Beta-Lactamase Gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 42, n. 8, p. 2006-2011, Aug. 1998.

HSIUNG, A. et al. Detecção e prevalência de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) em amostras bacterianas isoladas em hospitais brasileiros. *J. Bras. Patol.*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 241-246, 2000.

KONEMAN, E. W. et al. *Diagnóstico Microbiológico*: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

LLANES, R. et al. Evaluation of four methods for detecting the beta-lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1089-1091, Dec. 2003.

MAJIDUDDIN, F. K.; PALZKILL, T. Amino acid residues that contribute to substrate specificity of class A beta-lactamase SME-1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 49, n. 8, p. 3421-3427, 2005.

MOLAND, E. S. et al. Occurrence of Newer Beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 46, n. 12, p. 3837-3842, Dec. 2002.

NAAS, T.; NORDMANN, P. OXA-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des.*, Schiphol, v. 5, n. 11, p. 865-879, Nov. 1999.

NAGANO, R. et al. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various beta-lactamases, including class B metallo-beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 43, n. 10, p. 2497-2503, Oct. 1999.

NORDMANN, P. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 27, suppl. 1, p. S100-S106, Aug. 1998.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*, Oxford, v. 8, n. 6, p. 321-331, Jun. 2002.

PETROSINO, J. et al. Contributions of aspartate 49 and phenylalanine 142 residues of a tight binding inhibitory protein of β -lactamases. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, n. 4, p. 2394-2400, Jan. 1999.

RANDEGGER, C. C. et al. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 45, n. 6, p. 1730-1736, Jun. 2001.

REIS, A. O. et al. Avaliação da acurácia do teste de adição de clavulanato em disco para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL). *J. Bras. Patol.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 85-92, abr./jun. 1998.

REIS, A. O. et al. Detecção de β -lactamases de

- espectro ampliado (ESBL) pelo laboratório clínico: uma revisão crítica. *J. Bras. Patol.*, Rio de Janeiro, v. 37, n.1, p. 43-48, jan./mar. 2001.
- RUDGERS, G. W.; HUANG, W.; PALZKILL, T. Binding properties of a peptide derived from beta-lactamase inhibitory protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 45, n. 12, p. 3279-3286, Dec. 2001.
- SANTOS FILHO, L. et al. Determinação da produção de metalo-beta-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 291-296, 2002.
- SANTOS, R. C. V et al. Prevalência de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em pacientes do Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 55-57, 2003.
- SASTRE, J.; CARDONA, R.; Utilidad de las pruebas in vivo en alergia a beta-lactamicos. *Rev. Asoc. Colomb. Alerg. Inmunol.*, Bogotá, v. 9, n. 2, p. 46-50, 2000.
- SPELDOOREN, V. et al. Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 42, n. 4, p. 879-884, Apr. 1998.
- STAPLETON, P. D.; SHANNON, K. P.; FRENCH, G. L. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 beta-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 43, n. 8, p. 1881-1887, Aug. 1999.
- ZEMELMAN Z, R. et al. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. *Rev. Chil. Infect.*, Santiago, v. 19, supl. 2, p. S92-95. 2002.

