

---

## DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS (UPECS) ORIUNDOS DE PACIENTES DA COMUNIDADE

---

Monique Santos do Carmo, <sup>1</sup> Adriana de Mendonça Marques, <sup>1</sup> Luis Henrique Bastos Gonçalves, <sup>2 e 3</sup> Thiago Azevedo Feitosa Ferro, <sup>1</sup> Cristina de Andrade Monteiro, <sup>1, 3 e 4</sup> Maria Rosa Quaresma Bomfim, <sup>1</sup> Rosimary de Jesus Gomes Turri, <sup>1</sup> Valério Monteiro-Neto <sup>1 e 5</sup> e Patrícia de Maria Silva Figueiredo <sup>1 e 3</sup>

### RESUMO

A produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) consiste em um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. O vasto uso desses antibióticos no tratamento das infecções do trato urinário (ITU) tem agravado ainda mais esta problemática. As bactérias do tipo UPEC são consideradas as principais responsáveis por este tipo de infecção. Estudos para a compreensão da diversidade dessas enzimas no Brasil são escassos e, além disso, muitos deles são direcionados à pesquisa de isolados de origem hospitalar. Os objetivos do presente estudo foram detectar os genes que codificam as betalactamases TEM, CTX-M e SHV por PCR multiplex e identificar os isolados que as produzem por meio do método do disco aproximação. Do total dos isolados analisados, 12,8% apresentaram o fenótipo positivo para ESBL, enquanto 65,8% amplificaram sequências homólogas para os genes de betalactamases. Destes, os predominantes foram *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> com 42,7% e 18,8%, respectivamente. Dois isolados não amplificaram para nenhum dos genes em estudo, apesar de terem expressado a enzima no teste fenotípico. Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a necessidade de mais estudos que visem à caracterização molecular para elucidar a disseminação desse mecanismo de resistência entre bactérias oriundas de pacientes da comunidade.

DESCRITORES: Infecções bacterianas. Infecções por bactérias gram-negativas. Infecções por *Escherichia coli*.

- 
- 1 Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão, Brasil.
  - 2 Laboratório Gaspar, São Luís, Maranhão, Brasil.
  - 3 Instituto Florence de Ensino Superior (IFES).
  - 4 Instituto Federal do Maranhão (IFMA).
  - 5 Universidade Federal do Maranhão, UFMA.

Endereço para correspondência: Patrícia de Maria Silva Figueiredo. Pró Reitoria de Pós Graduação, Pesquisa e Extensão. Laboratório de Microbiologia Médica – Núcleo de Doenças Endêmicas e Parasitárias, Centro Universitário do Maranhão. Rua das Castanheiras, número 1, Bairro Renascença II, CEP 65075-120 São Luís, MA, Brasil. E-mail: figueiredo.patricia@gmail.com.

Recebido para publicação em: 12/3/2012. Revisto em: 21/8/2012. Aceito em: 26/9/2012.

## ABSTRACT

Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in isolates of uropathogenic *Escherichia coli* (UPECs) from patients in the community

The production of ESBL is an important mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials. The wide use of antibiotics in the treatment of urinary tract infections (UTI) has further aggravated this problem. Bacteria of the UPEC type are the main responsible for this kind of infection. Studies to understand the diversity of ESBL in Brazil are scarce and, in addition, many of them are directed to nosocomial samples. The objective of this study was to detect genes encoding  $\beta$ -lactamases TEM, SHV and CTX-M through multiplex PCR, as well as to identify the isolates that produce them through the disk approach method. From the total of isolates analyzed, 12.8% showed a positive phenotype for ESBL, while 65.8% amplified sequences homologous to the genes of  $\beta$ -lactamases. Among these, the most prevalent were  $bla_{TEM}$  and  $bla_{CTX-M}$ , with 42.7% and 18.8%, respectively. Two isolates did not amplify for any genes in this study, despite of having expressed the enzyme in the phenotypic test. Based on to our results, we suggest the development of further studies aiming at the molecular characterization to better elucidate the mechanism of spread of resistance among bacteria from patients in the community.

KEY WORDS: ESBL. UPEC. Disc approximation. PCR multiplex.

## INTRODUÇÃO

O mundo está enfrentando uma crescente resistência às drogas antibacterianas, o que representa uma séria ameaça para o manejo das doenças infecciosas (12, 18). O aumento nas taxas de resistência entre vários microrganismos e, de modo particular entre *Escherichia coli* uropatogênicas (UPECs), tem causado grande preocupação em países desenvolvidos e em desenvolvimento (19).

Dentre alguns vírus, fungos e bactérias (11), as UPECs são as principais responsáveis pelas infecções do trato urinário (ITUs), sendo detectadas em 70% a 90% das infecções urinárias agudas oriundas de bactérias (13). As ITUs representam um sério problema de saúde, pois afetam milhões de pessoas a cada ano (19) e constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade (34). Essas infecções são o principal motivo de consulta médica, ficando atrás apenas das infecções respiratórias (2). No Brasil, motivam 80% das consultas clínicas (24).

Entre os mais variados mecanismos de resistência aos antibióticos, destaca-se a produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Esta é uma classe de enzimas codificadas por genes que pode estar presente em integrons, transposons, cassetes gênicos, IS, contidos ou não em plasmídeos (15), e que apresenta a capacidade de hidrolisar e inativar uma grande variedade de antibióticos do grupo betalactâmico, incluindo cefalosporinas de terceira geração, penicilinas e aztreonam (25).

As enzimas da família SHV e TEM possuíam inicialmente espectro restrito e, após mutações em genes cromossômicos como TEM-1, TEM-2 e SHV-1, passaram a expressar um espectro estendido (14). Outras famílias de ESBL, tais como CTX-M e OXA, não se originaram da mesma forma (4). Atualmente são

conhecidos mais de 150 tipos de variantes de ESBL e a rápida velocidade na mutação dessas enzimas tem gerado grande preocupação em microbiologistas e infectologistas (29).

Estudos para a elucidação da diversidade e prevalência das ESBLs no Brasil são escassos em decorrência da ampla extensão territorial e da necessidade de uma grande amostragem (22). O monitoramento da ocorrência de isolados produtores de ESBL contribuirá de forma substancial para delinear a magnitude do problema, para sugerir opções de tratamento e indicar adequadas medidas de contenção (21).

Além disso, uma boa parte dos estudos sobre ESBL tem sido direcionada à pesquisa de amostras provenientes de pacientes hospitalizados, poucos têm relatado a presença dessas enzimas em isolados oriundos de pacientes da comunidade. Este estudo teve por objetivos realizar a detecção dos genes que codificam as betalactamases TEM, CTX-M e SHV por PCR multiplex e identificar os isolados que as produzem pelo teste do disco aproximação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras bacterianas

O estudo foi conduzido com base em 117 isolados de UPEC, previamente identificados, provenientes de diferentes pacientes da comunidade e que foram gentilmente cedidos por um laboratório particular da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. Para o controle de qualidade, foram utilizados os isolados *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (*bla*<sub>SHV-1</sub>), *E.coli* ATCC 35218 (*bla*<sub>TEM-1</sub>) como controles positivos e a cepa *E.coli* ATCC 25922, como controle negativo.

### Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do UniCeuma, São Luís-MA, sob o nº 00097/11.

### Detecção fenotípica

Todas as amostras foram submetidas ao método do disco aproximação para detecção fenotípica da produção de ESBL. Para cada isolado foi preparada uma suspensão bacteriana com soro fisiológico e turbidez correspondente a 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e semeadas em placas de ágar Müeller-Hinton (Merck).

Discos de aztreonam (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg) e cefepime (30 µg) foram colocados a uma distância de 20 mm do disco de amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg). As amostras foram consideradas produtoras

de ESBL mediante a formação de uma zona irregular de inibição (*ghost-zone*) entre o disco composto e o disco de uma das drogas betalactâmicas (8).

### Extração do DNA bacteriano

Para extração do DNA, foi suspensa uma colônia por isolado em 1 mL de água destilada estéril. Posteriormente, os isolados foram fervidos durante oito minutos em banho-maria. Subsequentemente, o DNA dos isolados foi mantido à temperatura de - 20°C (1).

### Deteção dos genes $bla_{TEM}$ , $bla_{CTX-M}$ e $bla_{SHV}$ por PCR multiplex

Os primers utilizados no estudo estão listados na Tabela 1. Os primers foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA) e todas as reações foram realizadas com 100 ng de DNA de cada microrganismo, 0,65  $\mu$ M de primers específicos, 1,25 U Taq DNA polimerase, tampão 5x, 2mM de  $MgCl_2$ , 0,25 mM de dNTPs e água miliQ para um volume final de 25  $\mu$ L. As condições para amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60° por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As amplificações foram realizadas no termociclador MyCycler (BioRad) e o produto amplificado de cada reação foi separado em gel de agarose a 1% ou 2,5% durante o período de uma hora (60/80 volts), sendo posteriormente corado com brometo de etídio na concentração de 20 $\mu$ g/100 mL de água e visualizado em luz ultravioleta com auxílio do transluminador (23).

*Tabela 1.* Primers usados na amplificação por PCR multiplex

Nome do primer	Sequência	Gene alvo	Amplicon (pb)	Referências
TEM-164.SE	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAAATGA	$bla_{TEM}$	445	23
TEM-165. AS	ACGCTCACC GGCTCCAGATTTAT			
CTX-M-U1	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	$bla_{CTX-M}$	593	5
CTX-M-U2	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG			
$bla$ -SHV.SE	ATGCGTTATATTCCGCTGTG	$bla_{SHV}$	747	26
$bla$ -SHV.AS	TGCTTTGTTATTCCGGCCAA			

## RESULTADOS

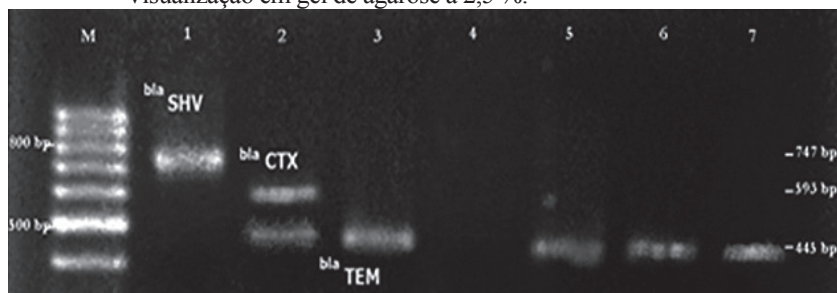
Os resultados estão sumarizados na Tabela 2. Do total dos 117 isolados, 12,8% apresentaram o fenótipo positivo para ESBL, enquanto 65,8% amplificaram seqüências homólogas para os genes de betalactamases (Figura 1). Entre estes, predominaram  $bla_{TEM}$  encontrado em 42,7% dos isolados, e  $bla_{CTX}$  com 18,8%. Apenas dois isolados apresentaram estes genes simultaneamente. O gene  $bla_{SHV}$  foi detectado em três isolados simultaneamente com o gene  $bla_{TEM}$ . Dois isolados

não amplificaram para nenhum dos genes em estudo, apesar de terem expressado a enzima no teste do disco aproximação.

**Tabela 2.** Resultados da PCR multiplex e do teste de disco aproximação

PCR MULTIPLEX	N° de isolados	DISCO APROXIMAÇÃO	
		Positivo	Negativo
Negativo	40	2 (5%)	38 (95%)
Positivo <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	22	6 (27,3%)	16 (72,7%)
Positivo <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	50	6 (12%)	44 (88%)
Positivo <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	2	0 (0%)	2 (100%)
Positivo <i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)
TOTAL	117	15	102

**Figura 1.** Detecção dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> por PCR multiplex. Visualização em gel de agarose a 2,5 %.



Canaletas: M = marcador de peso molecular (*ladder* de 100 pb); 1 = *K. pneumoniae* ATCC 700603 (controle positivo); 2 = isolado n°2; 3 = isolado n°8; 4 = isolado n°19; 5 = isolado n° 22; 6 = isolado n°33; 7 = isolado n°36.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Enquanto alguns isolados produtores de ESBL apresentam plena resistência aos antibióticos betalactâmicos de amplo espectro, expressando essas enzimas nos testes fenotípicos, muitos não expressam esse fenótipo mesmo abrigando os genes codificadores dessas enzimas (27).

Essas variações no perfil de sensibilidade podem depender do plasmídeo no qual o gene está inserido ou da região promotora que controla a síntese da betalactamase. Como a degradação do anel betalactâmico geralmente acontece de forma branda, a resistência a esses agentes geralmente não é visualizada quando são realizados testes *in vitro* (6), como ocorreu com muitos isolados deste estudo quando foram submetidos ao teste do disco aproximação.

Soma-se a isso o fato de o inóculo padronizado para os testes de sensibilidade não ser suficiente para a detecção da resistência, uma vez que a enzima pode estar disponível em pequenas concentrações e o ácido clavulânico não estar presente em quantidades apropriadas para inibi-la de forma eficaz, não sendo possível, assim, visualizar-se o fenótipo quanto à produção de ESBL (7).

As ESBLs do tipo TEM são frequentemente encontradas em bactérias gram-negativas, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae* (20), corroborando, assim, os dados obtidos neste trabalho. Embora o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> tenha sido identificado com menor frequência, as betalactamases codificadas por ele estão em rápida expansão (32). Alguns isolados apresentaram os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> simultaneamente. Resultados similares foram descritos com isolados de *E. coli* e outras enterobactérias (23).

As enzimas da família SHV são encontradas com maior incidência em isolados de *K. pneumoniae* (10, 17, 31), o que justifica a baixa incidência do gene *bla*<sub>SHV</sub> nas UPECs deste estudo, que são oriundas de pacientes da comunidade. Dois isolados não amplificaram para nenhum dos genes em estudo, apesar de terem expressado a enzima no teste fenotípico. Dados semelhantes foram obtidos com isolados de *E. coli*, sugerindo que esses isolados carregam outro tipo de gene ESBL (23).

Embora até pouco tempo os microrganismos produtores de ESBL fossem considerados um problema quase restritamente nosocomial, um estudo realizado em hospitais espanhóis mostrou que mais da metade dos isolados de *E. coli* produtores dessas enzimas haviam sido isolados de amostras de pacientes ambulatoriais, principalmente de amostras de urina (16).

A detecção de um maior número de isolados que abrigam os genes de betalactamases em relação aos testes fenotípicos ressalta a importância do uso de métodos moleculares no esclarecimento dos aspectos epidemiológicos das bactérias resistentes aos antibióticos betalactâmicos. Dessa forma, uma identificação precisa de bactérias produtoras de ESBLs é importante não somente para o gerenciamento da conduta terapêutica, mas também para a aplicação de medidas de controle que objetivem reduzir ou impedir sua disseminação (3, 9, 33).

Técnicas mais específicas, como as de PCR e o sequenciamento de DNA, permitem diferenciar, entre isolados de um mesmo clone, mutações pontuais responsáveis pela resistência específica a determinadas classes de agentes antimicrobianos, como a resistência aos betalactâmicos (29).

Além do uso de técnicas que garantam uma maior confiabilidade na detecção dos mecanismos de resistência, como a produção de ESBLs, é de suma importância que se faça um rígido controle do uso de antimicrobianos, contribuindo, assim, para reduzir a pressão seletiva e para amenizar a incidência de isolados que produzem essas enzimas.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, que demonstraram uma considerável incidência de UPECs oriundas de pacientes da comunidade e

produtoras de ESBL, é importante chamar a atenção para a necessidade de mais estudos que visem à caracterização molecular para elucidar a disseminação desse mecanismo de resistência na comunidade.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), conforme os processos BATI 502/10 – Diogo Marcelo Lima Ribeiro e BATI 02505/10 – Monique Santos do Carmo.

#### REFERÊNCIAS

1. Agersborg A, Reidun D, Martinez I. Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int J Food Microbiol* 35: 275-280, 1997.
2. Andreu A, Alos JI, Gobernado M, Marco F, De La Rosa M, Garcia-Rodriguez JA. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio Nacional Multicéntrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23: 4-9, 2005.
3. Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 36: 2169-2172, 1998.
4. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1-14, 2004.
5. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR and the Canadian nosocomial infection surveillance program, Health Canada. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harbouring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3758-3764, 2004.
6. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951, 2001.
7. Bush K. New beta-lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. *Clin Infect Dis* 32: 1085-1089, 2001.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18<sup>th</sup> informational supplement*. CLSI document M100-D18. Wayne, PA, 2008.
9. Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 199-212, 1999.
10. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *J Antimicrob Chemother* 47: 463-465, 2001.
11. Corrêa LA, Canalini AF, Matheus WE. Etiologia das infecções do trato urinário. *Int Braz J Urol* 29: 7-10, 2003.
12. Croft AC, D'Antoni AV, Terzulli SL. Update on the antibacterial resistance crisis. *Med Sci Monit* 13: 103-118, 2007.
13. De Cueto M. Microbiological diagnosis of urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23: 9-14, 2005.
14. Fiett J, Paucha A, Miaczyńska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M. A Novel Complex Mutant  $\beta$ -Lactamase, TEM-68, Identified in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from an Outbreak of Extended- Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1499-1505, 2000.

15. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64: 3-10, 2009.
16. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21: 77-82, 2003.
17. Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am* 11: 875-887, 1997.
18. Kotra LP, Samama J, Mobashery S. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. In: Lewis K, Slayers AA, Taber HW, Wax RG. *Bacterial resistance to antimicrobials*. Marcel Decker. New York, 2002.
19. Lina TT, Rahman SR, Gomes DJ. Multiple-antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Banglad J Microbiol* 24: 19-23, 2007.
20. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8: 557-584, 1995.
21. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Trends in Production of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol* 44: 1659-1664, 2006.
22. Minarini LA, Clímago EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, Darini AL. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella spp.* at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 56: 587-591, 2008.
23. Monstein HJ, Östholm-Balkhed A, Nilsson NV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*<sup>SHV</sup>, *bla*<sup>TEM</sup> and *bla*<sup>CTX-M</sup> genes in *Enterobacteriaceae*. *Apmis* 115: 1400-1408, 2007.
24. Moreira MAA, Costa FS, Nogueira NAP. Bacteriúria assintomática em gestantes atendidas no Centro de Saúde Ambulatorial Abdornal Machado (CESA-AM) em Crateús, CE. *Rev Bras An Clin* 35: 41B, 2003.
25. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended-spectrum beta-lactamases: Epidemiology, detection and treatment. *Pharmacotherapy* 21: 920-928, 2001.
26. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA and the International *Klebsiella* study group. Extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3553-3560, 2003.
27. Patterson JE. Antibiotic utilization: is there effect on antimicrobial resistance? *Chest* 119: 426-430, 2001.
28. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended- spectrum  $\beta$ -lactamases. *Res Microbiol* 155: 409-421, 2004.
29. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 47: 273-295, 2003.
30. Tosin I, Silbert S, Sader HS. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis* 7: 360-369, 2003.
31. Tzouvelekis LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 5: 847-864, 1999.
32. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX – M - type - beta-lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 14: 137-142, 2000.
33. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *J Clin Microbiol* 45: 1167-1174, 2007.
34. Zdziarski J, Svanborg C, Wullt B, Hacker J, Dobrindt U. Molecular Basis of Commensalism in the Urinary Tract: Low Virulence or Virulence Attenuation? *Infect Immun* 76: 695-703, 2008.