

Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

Primeira submissão em 07/09/10
Última submissão em 10/04/11
Aceito para publicação em 14/04/11
Publicado em 20/08/11

Alternative methods for the detection of extended-spectrum-beta-lactamase in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae

Alexsander Costa Martins¹; Simone Ulrich Picoli²

unitermos	resumo
Betalactamase de espectro estendido Resistência bacteriana <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<p>Introdução: A resistência a antimicrobianos tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo e, embora exista uma variedade de mecanismos de resistência, destaca-se a produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) como um dos principais. Essas enzimas são mediadas por plasmídios, conferem resistência a vários antimicrobianos betalactâmicos e são inibidas por compostos, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Objetivo: O objetivo deste estudo foi comparar metodologias alternativas à técnica padrão preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para detecção de ESBL. Material e método: Foram realizados testes com 36 isolados (26 de <i>E. coli</i> e 10 de <i>K. pneumoniae</i>) mediante disco combinado (CLSI) e técnicas alternativas designadas meio disco (MD) e substituição de discos (SD). Conclusão: As duas metodologias propostas apresentaram resultados satisfatórios com sensibilidade superior a 90% e custo inferior à técnica de referência (disco combinado), podendo ser utilizadas na pesquisa de ESBL.</p>

abstract	key words
<p>Introduction: Antimicrobial resistance has increased apace in Brazil and worldwide in the last years, even though there is a great variety of resistance mechanisms and extended spectrum beta-lactamases (ESBL) is among the main ones. These enzymes are plasmid mediated, which causes resistance to some beta-lactam antimicrobials and are inhibited by compounds such as clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. Objective: The objective of this study was to compare alternative methods to the standard ESBL detection technique recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Material and method: Tests with 36 isolates (26 <i>E. coli</i> and 10 <i>K. pneumoniae</i>) were performed by means of CLSI disk diffusion method and alternative techniques designated as half disk (HD) and disk substitution (SD). Conclusion: Both methods yielded satisfactory results with higher sensitivity (90%) and lower costs in comparison with the reference one (CLSI disk diffusion method), which corroborates its use in ESBL investigation.</p>	<p><i>Extended-spectrum-beta-lactamase</i> <i>Bacterial resistance</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i></p>

1. Biomédico.

2. Mestra em Microbiologia; professora adjunta da Universidade Feevale.

Introdução

A resistência a antimicrobianos tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando a necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais frequentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência⁽²⁴⁾. Entre as bactérias Gram-negativas, responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais, a produção de betalactamases constitui um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos⁽¹⁷⁾.

A família *Enterobacteriaceae* é composta por mais de 30 gêneros e 130 espécies⁽⁹⁾ de bacilos Gram-negativos que podem ser responsáveis por diferentes doenças infecciosas, sendo isolados de qualquer amostra clínica⁽¹⁸⁾. Nesse grupo, os gêneros mais frequentemente associados são *Escherichia sp.* e *Klebsiella sp.*, mas também podem envolver espécies de *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Morganella sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Salmonella sp.* e *Serratia sp.*^(2, 6, 8, 11, 13, 16, 22).

Embora exista grande variedade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, um dos mais importantes é a produção de betalactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos relacionados, tornando-os inativos. Destaca-se entre eles a produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL), principalmente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas⁽¹⁰⁾. Essas enzimas são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e são inibidas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam⁽²³⁾.

O uso excessivo de antimicrobianos em humanos e animais, as infecções hospitalares cruzadas, a cadeia alimentar, o comércio e a migração humana parecem ter contribuído para a recente propagação de ESBLs fora dos hospitais, embora o papel desses fatores seja variável e ligado a determinadas situações epidemiológicas⁽⁵⁾.

O laboratório de microbiologia tem um importante papel na detecção de bactérias produtoras de ESBL, pois o rápido diagnóstico é necessário para adequado manejo clínico dos pacientes hospitalizados, visto que há dados indicando a relação dessa enzima com complicações clínicas e maiores taxas de mortalidade^(20, 23). A demora no diagnóstico leva à permanência do paciente no ambiente hospitalar por tempo prolongado⁽²³⁾, possibilitando disseminação intra e inter-hospitalar dessas enzimas⁽²⁵⁾ antes da implementação de medidas de controle. Além disso, o paciente pode receber terapia inadequada, levando à falha terapêutica.

Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽³⁾, a confirmação dessa enzima em isolados de *Klebsiella*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* deveria ser feita por disco combinado de cefalosporinas de terceira geração com clavulanato. Desde 2010, esse órgão mudou suas recomendações em relação à pesquisa e à confirmação dessa enzima nos isolados dessas enterobactérias por meio da alteração de pontos de corte interpretativos para as cefalosporinas de amplo espectro.

Contudo, no contexto epidemiológico, reforça-se a relevância da pesquisa laboratorial contínua, dada a capacidade elevada de transmissibilidade da ESBL (via plasmídios). Dessa forma, a busca de técnicas alternativas para sua detecção é igualmente necessária para facilitar o rastreamento dessa betalactamase em isolados clínicos comunitários e/ou nosocomiais.

Objetivo

Comparar metodologias alternativas ao padrão-ouro preconizado pelo CLSI para confirmação de ESBL em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, visando redução de custos e exequibilidade.

Material e método

Para a realização dessa pesquisa, foram utilizadas 36 cepas positivas para ESBL (método fenotípico confirmatório recomendado pelo CLSI de discos combinados), sendo 26 cepas de *Escherichia coli* e 10 de *Klebsiella pneumoniae* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Feevale. Elas estavam armazenadas em caldo glicerinado a -20°C. Os testes foram realizados entre setembro e outubro de 2009.

Para a execução dos testes, as cepas congeladas foram repicadas em ágar sangue (MCBarth) e incubadas a 35°C ± 2°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, foi realizado novo repique em ágar McConkey (MCBarth) e a incubação foi feita em condições adequadas. Com o crescimento secundário, foi preparada uma suspensão correspondente à escala 0.5 de McFarland e semeada em placa de ágar Mueller-Hinton (MCBarth) para a realização dos testes fenotípicos de disco combinado (DC) (CLSI), substituição de discos (SD) e meio disco (MD) (metodologias alternativas).

Para o controle de qualidade, foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC®): *Escherichia*

coli ATCC® 25922 (ESBL negativa) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (ESBL positiva).

Detecção de ESBL pelo teste padrão CLSI disco combinado

A detecção dessa enzima foi padronizada segundo o documento *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Informational Supplement M100-S19*, de janeiro de 2009, página 120 (CLSI), para cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis*. Se as três primeiras bactérias anteriormente citadas apresentarem halos de inibição diminuídos para betalactâmicos de amplo espectro (ceftazidima [CAZ] \leq 22 mm; aztreonam \leq 27 mm; cefotaxima [CTX] \leq 27 mm; ceftriaxona \leq 25 mm; cefpodoxima \leq 17 mm), deve-se confirmar a presença de ESBL. Na versão subsequente desse documento (*20th Informational Supplement M100-S20*), de janeiro de 2010, página 30 (CLSI), ocorreram alterações nos pontos de corte interpretativos para os respectivos betalactâmicos, mas ainda são relevantes a pesquisa e a confirmação da enzima sob a ótica epidemiológica.

A confirmação foi realizada com discos de CAZ 30 μ g, ceftazidima + ácido clavulânico (CCAZ) 30 μ g/10 μ g, CTX 30 μ g e cefotaxima + ácido clavulânico (CCTX) 30 μ g/10 μ g (Biorad) (**Figura**). O resultado foi considerado positivo quando a diferença de medida de halos do antimicrobiano com clavulanato em relação ao mesmo sem o inibidor foi \geq 5 mm.

Detecção de ESBL pelo teste alternativo substituição de disco

Esse teste consistiu na colocação de dois discos de amoxicilina + ácido clavulânico (AMC) 20 μ g/10 μ g (Biorad) na superfície de ágar Müller-Hinton (MCBarth) em temperatura ambiente. Após 30 minutos, os discos foram retirados com pinça estéril e foram colocados, no mesmo local, discos de CAZ 30 μ g e CTX 30 μ g (Biorad) (Figura). Após incubação apropriada, os halos que continham ácido clavulânico foram medidos e comparados com aqueles dos discos contendo apenas as cefalosporinas. Diferença \geq 5 mm foi considerada cepa positiva para ESBL.

Detecção de ESBL pelo teste alternativo meio disco

Para esse teste, utilizaram-se duas metades de discos de antimicrobianos dispostos juntamente na placa, de modo

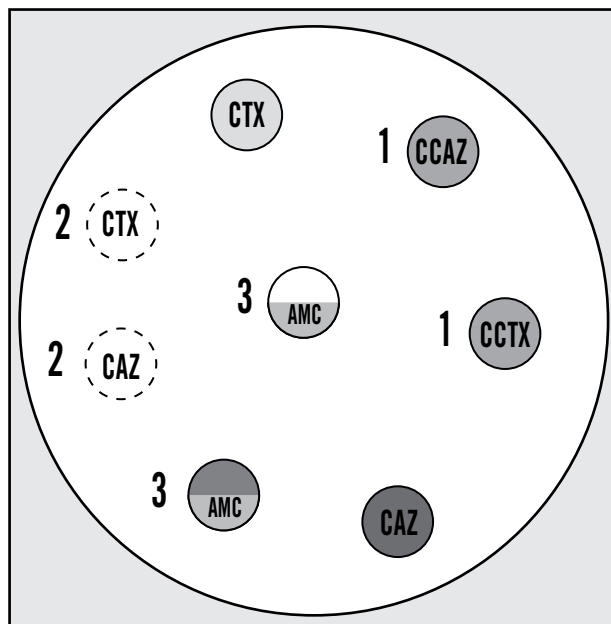


Figura – Representação esquemática da disposição dos discos para os testes de disco combinado (1), substituição de discos (2) e meio disco (3) em placa de ágar Müller-Hinton (150 mm x 15 mm)

CCAZ: ceftazidima + ácido clavulânico; CCTX: cefotaxima + ácido clavulânico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; AMC: amoxicilina + ácido clavulânico.

a formar um único disco (Figura): uma metade de AMC 20 mg/10 mg e a outra de CAZ 30 mg ou CTX 30 mg (Biorad). Para a obtenção das metades de discos, cada disco inteiro foi tomado com pinça estéril e cortado ao meio com auxílio de tesoura estéril; as metades de discos foram recolhidas dentro de placa de petri estéril. Os materiais empregados no corte dos discos (pinças e tesouras) foram previamente esterilizados em autoclave (121°C, 15 minutos). A leitura do teste foi considerada positiva quando a diferença de medida de halos do antimicrobiano com clavulanato em relação ao mesmo sozinho foi \geq 5 mm (o diâmetro do halo de inibição foi mensurado na linha de união entre as duas metades dos referidos discos).

Resultados

Entre os 36 isolados bacterianos produtores de ESBL avaliados, 26 (72,2%) eram *Escherichia coli* e 10 (27,8%) eram *Klebsiella pneumoniae*. Considerando que uma cepa é dita produtora de ESBL quando o teste é positivo para um ou mais dos substratos empregados, constatou-se que todas as amostras avaliadas apresentaram resultado positivo para a enzima por meio dos testes fenotípicos alternativos MD e/ou SD.

O teste padrão de DC, recomendado pelo CLSI, foi positivo nas 36 cepas mediante o substrato CTX, enquanto 26 delas também revelaram ESBL simultaneamente com emprego de CAZ (**Tabela**).

Nas metodologias alternativas, a técnica MD confirmou ESBL em 34 (94,4%) cepas, todas detectadas por CTX e 19 (52,8%) delas igualmente positivas diante de CAZ. O teste SD mostrou resultados semelhantes ao MD: 33 (91,7%) cepas positivas mediante CTX e 18 (50%) também positivas com o substrato CAZ (Tabela). Uma amostra de *Escherichia coli* foi ESBL positiva somente no teste MD com o substrato CTX.

Discussão

O trabalho do laboratório de microbiologia é imprescindível na detecção das enterobactérias produtoras de ESBL. A detecção precoce desses microrganismos multirresistentes é muito importante para se instaurarem o tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes necessários para se evitar a disseminação desses patógenos⁽¹⁴⁾.

É relevante destacar que a pesquisa fenotípica desse mecanismo enzimático tem relevância tanto no contexto epidemiológico quanto no terapêutico. Após a alteração dos pontos de corte interpretativos para as cefalosporinas e carbapenems (CLSI)⁽⁴⁾ em enterobactérias, iniciou-se uma discussão mundial a respeito dessa mudança. Segundo o documento do CLSI, os novos critérios interpretativos para cefalosporinas já compreendem a presença de mecanismos de resistência como ESBLs e, por essa razão, não seria mais obrigatória a pesquisa confirmatória da referida enzima.

Contudo, diferentes publicações científicas mostram que pode ocorrer falha terapêutica quando infecções por *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* (ESBL positiva), sensível à cefalosporinas de amplo espectro e com baixos

valores de concentração inibitória mínima (MIC), são tratadas com esses antibióticos. De acordo com Paterson *et al.*, 40% das infecções graves causadas por essas bactérias (*Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae* ESBL positiva com MICs < 2 mg/l para cefalosporinas de amplo espectro) resultaram em falha no tratamento⁽¹⁹⁾. Por outro lado, Bin *et al.* relataram êxito terapêutico com emprego de CAZ em infecção severa causada por *Escherichia coli*, cuja MIC não correspondia à sensibilidade (MIC CAZ 8 mg/l – intermediário). Um aspecto muito importante a ser destacado nessa situação diz respeito à dose de CAZ utilizada: 2 g a cada 8 horas⁽¹⁾ e não 1 g a cada 8 horas, como descrito no documento do CLSI 2010.

Algumas publicações que abordam o desfecho de infecções causadas por isolados ESBLs positivos e tratados com cefalosporinas fornecem margem à discussão, pois não indicam a dose de antibiótico utilizada ou não descrevem a MIC para a cefalosporina. Nesse contexto, Kim *et al.* afirmam que praticamente 43% dos casos de infecção por bactérias produtoras de ESBL tiveram desfecho não favorável no uso de cefalosporinas, mas não descrevem a MIC correspondente⁽¹²⁾, dificultando a interpretação desses resultados.

As taxas de prevalência de ESBL em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são diversificadas em todo o mundo. Dados do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program mostram as variações nesse índice em isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL: América Latina = 8,5%, Canadá = 4,2%, EUA = 3,3% e Europa = 11,1%; enquanto em *Klebsiella pneumoniae* os índices nesses mesmos locais são maiores: 45,4%; 4,9%; 7,6%; 22,6%, respectivamente⁽²⁵⁾.

Dados do SENTRY para o Brasil mostram alta prevalência de isolados produtores de ESBL: 50,3% em *Klebsiella pneumoniae* e 9,1% em *Escherichia coli*. Embora as taxas de espécies produtoras de ESBL possam variar significativamente de região para região ou mesmo de hospital

Tabela Resultados da detecção de ESBL em cepas positivas para a enzima com emprego de metodologias alternativas (MD e SD)

Bactéria	n (%)	DC CAZ (%)	DC CTX (%)	MD CAZ (%)	MD CTX (%)	SD CAZ (%)	SD CTX (%)
<i>Escherichia coli</i>	26 (72,2)	20 (55,5)	26 (72,2)	15 (41,7)	24 (66,7)	13 (36,1)	23 (63,9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 (27,8)	6 (16,7)	10 (27,8)	4 (11,1)	10 (27,7)	5 (13,9)	10 (27,8)
Total (%)	36 (100)	26 (72,2)	36 (100)	19 (52,8)	34 (94,4)	18 (50)	33 (91,7)

ESBL: betalactamase de espectro estendido; MD: meio disco; SD: substituição de discos; DC: disco combinado; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima.

para hospital em uma mesma região geográfica, as taxas do Brasil são muito superiores àquelas vistas na maioria das outras partes do mundo⁽²¹⁾, justificando sua constante pesquisa.

O CLSI recomenda que a triagem e a confirmação de ESBL sejam realizadas para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis* com sensibilidade diminuída diante de betalactâmicos de amplo espectro. Por outro lado, a descrição de ESBL em outras espécies de enterobactérias já foi relatada^(2, 6, 8, 11, 13, 16, 22). Contudo, o presente trabalho utilizou somente isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* positivos para ESBL, excluindo, nesse momento, as demais espécies recomendadas.

Nos testes realizados neste estudo, observou-se que grande parte das enzimas foi identificada pelo substrato CTX, sugerindo que a principal enzima ESBL seja uma cefotaximase (CTX-M), corroborando com os dados de outros trabalhos realizados no Brasil⁽⁷⁾ e em outros continentes⁽¹⁵⁾.

Ambos os testes alternativos (MD e SD) mostraram sensibilidade superior a 90%, mas o MD (94,4%) foi ligeiramente superior ao SD (91,6%), denotando a viabilidade de utilizá-los para pesquisa de ESBL.

No tocante à exequibilidade, ficou evidente que ambos os testes necessitam de alguns cuidados em sua confecção: os discos que compõem o MD devem ficar unidos de modo a formar um disco inteiro, enquanto a SD requer a substituição do disco exatamente no local onde o anterior se encontrava. O eventual descumprimento dessas exigências, neste estudo, pode explicar a não confirmação de ESBL em duas cepas por MD e em três por SD. Ainda assim, percebeu-se maior facilidade em executar o teste MD, uma

vez que ele não exige cuidados referentes ao tempo para substituição do disco de antimicrobiano.

Em relação aos custos, o valor dos discos necessários para confecção de cada teste foi: R\$ 1,68 no DC (CLSI), R\$ 0,80 no MD e R\$ 1,20 na SD. Pode-se observar que o MD é mais vantajoso financeiramente para o laboratório, pois reduz custos devido ao fato de utilizar somente metade do disco de cada antimicrobiano.

Este estudo apresentou algumas limitações, como a não inclusão das demais cepas produtoras de ESBL descritas no CLSI (*Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis*) e o número reduzido de amostras avaliadas. Devido à não equivalência de resultados entre as técnicas propostas (MD e SD) em comparação com a metodologia padrão, acredita-se ser prudente não empregá-las em unidades hospitalares com grande incidência de ESBL. De qualquer maneira, fica demonstrada a possibilidade de emprego de técnicas alternativas com boa sensibilidade e menor custo na confirmação desse importante mecanismo de resistência bacteriana, especialmente em locais onde não exista elevada prevalência de ESBL.

Conclusão

As técnicas alternativas propostas são úteis na confirmação de ESBL em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, pois apresentaram sensibilidade satisfatória e custo inferior ao método preconizado pelo CLSI. Assim, ficam indicadas outras metodologias capazes de confirmar esse relevante mecanismo de resistência que dificulta a terapêutica com antibióticos betalactâmicos usualmente empregados na prática clínica.

Referências

1. BIN, C. *et al.* Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 56, n. 4, p. 351-7, 2006.
2. BRADFORD, P. A. Extended-spectrum B-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microb Rev*, v. 14, p. 933-51, 2001.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Table M100-S19*. Wayne, PA, USA, 2009.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Table M100-S20*. Wayne, PA, USA, 2010.
5. COQUE, T. M. *et al.* Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*, v. 13, n. 47, pii=19044, 2008.
6. COUDRON, P. E. *et al.* Occurrence and detection of extended-spectrum B-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *J Clin Microb*, v. 35, p. 2593-7, 1997.
7. D'AZEVEDO, P. A. *et al.* Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards

- (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Braz J Infect Dis*, v. 8, n. 5, p. 372-7, 2004.
8. EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical significance of extended-spectrum B-lactamases in a Tertiary-Care Medical Center. *J Clin Microb*, v. 35, p. 2061-7, 1997.
 9. FARMER III, J. J. *et al.* *Enterobacteriaceae* introduction and identification. In: MURRAY, P. R. *et al.* (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 2007. p. 649-69.
 10. FRANCISCO, W.; JEA, A. H. Y. *Resistência à b-lactamases por presença de ESBL*. Disponível em: <www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm>. Acesso em: 15 nov. 2009.
 11. GANGONUÉ-PIÉBOJI, J. *et al.* Extended-spectrum-B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. *J Clin Microb*, v. 43, p. 3273-7, 2005.
 12. KIM, Y. K. *et al.* Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 5, p. 1481-91, 2002.
 13. LUZZARO, F. *et al.* Trends in production of extended-spectrum B-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the Second Italian Nationwide Survey. *J Clin Microb*, v. 44, p. 1659-64, 2006.
 14. MENEZES, E. A. *et al.* Frequência de cepas produtoras de enzima betalactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza. *Rev Bras An Clin*, v. 40, n. 1, p. 7-11, 2008.
 15. NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum B-lactamases among members of the family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. *J Clin Microb*, v. 41, p. 155-58, 2003.
 16. NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 3098-101, 2006.
 17. NOGUEIRA, K. S. *et al.* Occurrence of extended-spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 10, n. 6, p. 390-5, 2006.
 18. O'HARA, C. M. *et al.* Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. *Clin Microb Rev*, v. 13, p. 534-46, 2000.
 19. PATERSON, D. L. *et al.* Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microb*, v. 39, n. 6, p. 2206-12, 2001.
 20. PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. Extended-spectrum B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, p. 159-66, 2008.
 21. SADER, H. S. *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*, v. 5, p. 200-14, 2001.
 22. SPANU, T. *et al.*; The Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum B-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to B-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 196-202, 2002.
 23. STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum B-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect*, v. 47, p. 273-95, 2003.
 24. TOSIN, I. *Avaliação do modo de disseminação da resistência bacteriana a antibacterianos nos hospitais brasileiros*. São Paulo: [s. n.], 2001.
 25. WINOKUR, P. L. *et al.* Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum B-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis*, v. 32, suppl. 2, p. S94-103, 2001.

Endereço para correspondência

Simone Ulrich Picoli
 Universidade Feevale
 Laboratório de Biomedicina – Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 RS 239, 2.755
 CEP: 93352-000 – Novo Hamburgo-RS