

# 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 Martins<sup>1</sup>; Simone Ulrich Picoli<sup>2</sup>

unitermos	resumo
Betalactamase de espectro estendido  Resistência bacteriana  <i>Escherichia coli</i>  <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<p><b>Introdução:</b> 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. <b>Objetivo:</b> O objetivo deste estudo foi comparar metodologias alternativas à técnica padrão preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para detecção de ESBL. <b>Material e método:</b> 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). <b>Conclusão:</b> 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><b>Introduction:</b> 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. <b>Objective:</b> 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). <b>Material and method:</b> 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). <b>Conclusion:</b> 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<sup>(24)</sup>. 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<sup>(17)</sup>.

A família *Enterobacteriaceae* é composta por mais de 30 gêneros e 130 espécies<sup>(9)</sup> de bacilos Gram-negativos que podem ser responsáveis por diferentes doenças infecciosas, sendo isolados de qualquer amostra clínica<sup>(18)</sup>. 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.<sup>(2, 6, 8, 11, 13, 16, 22)</sup>.

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<sup>(10)</sup>. Essas enzimas são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e são inibidas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam<sup>(23)</sup>.

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<sup>(5)</sup>.

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<sup>(20, 23)</sup>. A demora no diagnóstico leva à permanência do paciente no ambiente hospitalar por tempo prolongado<sup>(23)</sup>, possibilitando disseminação intra e inter-hospitalar dessas enzimas<sup>(25)</sup> 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)<sup>(3)</sup>, 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, 19<sup>th</sup> 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 (*20<sup>th</sup> 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.

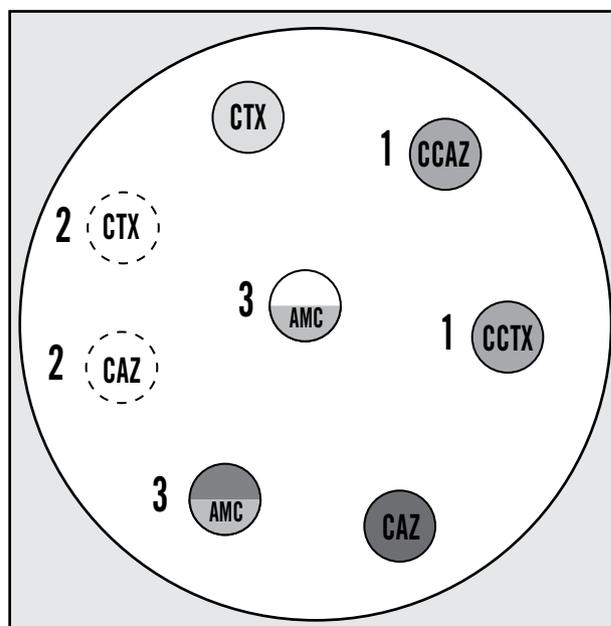
A confirmação foi realizada com discos de CAZ 30  $\mu$ g, ceftazidima + ácido clavulânico (CCAZ) 30  $\mu$ g/10  $\mu$ g, CTX 30  $\mu$ g e cefotaxima + ácido clavulânico (CCTX) 30  $\mu$ g/10  $\mu$ g (Biorad) (**Figura**). O resultado foi considerado positivo quando a diferença de medida de halos 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  $\mu$ g/10  $\mu$ 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  $\mu$ g e CTX 30  $\mu$ 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<sup>(14)</sup>.

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)<sup>(4)</sup> 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<sup>(19)</sup>. 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<sup>(1)</sup> 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<sup>(12)</sup>, 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<sup>(25)</sup>.

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<sup>(21)</sup>, 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<sup>(2, 6, 8, 11, 13, 16, 22)</sup>. 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<sup>(7)</sup> e em outros continentes<sup>(15)</sup>.

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 21<sup>st</sup> 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  $\beta$ -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