

AVALIAÇÃO DE DISTÂNCIAS NA DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM CEPA PADRÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

EVALUATION OF DISTANCES IN THE PHENOTYPIC DETECTION OF BETALACTAMASE OF SPECTRUM EXTENDED IN ATCC™ *Klebsiella pneumoniae*

Thais Drusch De **Oliveira**¹, Raul Gomes **Aguera**^{2*}, Alessandra Barrochelli da Silva **Ecker**³

¹ Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Ingá - UNINGÁ (Maringá/PR, Brasil).

² Mestrando do Programa de Biociências e Fisiopatologia na Universidade Estadual de Maringá (Maringá/PR, Brasil).

³ Mestre pelo Programa de Biociências e Fisiopatologia na Universidade Estadual de Maringá. Docente do Curso de Graduação em Biomedicina e Farmácia do Centro Universitário Ingá - UNINGÁ (Maringá/PR, Brasil).

* Rodovia PR 317, nº 6114, Saída para Astorga. Maringá, Paraná, Brasil, CEP:87035- 510. E-mail: raul1994_gomes@hotmail.com

Submetido em: 15/04/2019; Aceito em: 10/07/2020.

RESUMO

Dentre as bactérias com alta resistência a antimicrobianos, as Gram-negativas produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) tornaram-se um grande problema de saúde pública. As cepas produtoras de ESBL são frequentemente associadas a pneumonias, septicemias, infecções urinárias, bacteremias e meningites, entre outras infecções. A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram negativo comum a microbiota normal do intestino humano. Possui altas taxas de cepas produtoras de ESBL que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico dos antimicrobianos que o possuem. A metodologia do TSDD utiliza o sinergismo dos antibióticos difundidos no ágar *Muller Hinton* (MHA), para que ocorra o aparecimento da área fantasma, entretanto o sinergismo pode apresentar resultados falsos quando a distância entre os disco contendo os fármacos é maior do que a capacidade de difusão do antimicrobiano no MHA. A detecção de ESBL é utilizada frequentemente nos laboratórios de microbiologia por ser uma técnica de baixo custo, fácil execução e com resultados confiáveis, entretanto não há um consenso quanto as distâncias padronizadas entre os discos. O objetivo deste trabalho é avaliar até que distâncias de centro a centro podem ser utilizadas na rotina laboratorial na detecção fenotípica de ESBL por teste de sinergismo por disco duplo (TSDD). No presente trabalho foi utilizado uma cepa de ATCC™ 700603 de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, de acordo com o recomendado pelo BrCAST. Nossos resultados apontam que as variações nas distâncias podem trazer resultados falso-negativo para valores maiores do que 34 mm e menores do que 20 mm.



Palavras-chave: Antimicrobianos, Infecções por Bactérias Gram-Negativas, *Klebsiella pneumoniae*, Microbiologia.

ABSTRACT

Among bacteria with high resistance to antimicrobials, the Gram-negative types, producers of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), have become an extensive problem for public health. ESBL-producing strains are often associated with various infections, such as pneumonia, septicemia, urinary infections, bacteremia, and meningitis. *Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative bacillus found in the normal microbiota of the human intestine. This microorganism has high rates of ESBL-producing strains that catalyze the hydrolysis of the beta-lactam ring of antimicrobials that have it. The TSDD methodology uses the synergism of the antibiotics diffused in the *Muller Hinton* agar (MHA) so that the appearance of the phantom area occurs. However, this synergism may present false results in case the distance between the discs containing the drugs is greater than the capacity of antimicrobial diffusion in MHA. ESBL detection is a low-cost technique that has been frequently used in microbiology laboratories because it is easy to perform and provides reliable results, though a consensus as to the standard distances between disks is nonexistent. The objective of this research is to measure how far, considering center to center, this laboratory routine can be used in the double-disc synergism test (TSDD) for phenotypic detection of ESBL. A strain of ESBL-producing *K. pneumoniae* ATCC™ 700603 was used to perform this work as recommended by BrCAST. Our results indicate that the variations in distances can bring false-negative results to values greater than 34 mm and smaller than 20 mm.

Keywords: Antimicrobials, Gram-Negative Bacterial Infections, *Klebsiella pneumoniae*, Microbiology.

INTRODUÇÃO

O estudo das bactérias Gram-negativas produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) se faz necessário pois tem se tornado um grande problema de saúde pública, por conta de sua alta resistência aos antimicrobianos. Esses mecanismos de resistência são transmitidos por plasmídeos, portanto essas modificações são de fácil disseminação. As cepas produtoras de ESBL estão frequentemente associadas a pneumonias, septicemias, infecções urinárias, bacteremias e meningites, entre outras infecções (LAGO; FUENTEFRÍA, 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012; COELHO *et al.*, 2015).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram negativo que faz parte da microbiota normal do intestino humano. Possui altas taxas de cepas produtoras de ESBL que podem ser encontradas na comunidade e nos hospitais, podendo ainda permanecer viáveis nas superfícies hospitalares por muito tempo. Isolados produtores de ESBL catalisam a hidrólise do anel betalactâmico dos antimicrobianos que o possuem. Esse é considerado um dos mais importantes mecanismos de resistência contra penicilinas e cefalosporinas, sendo as

cefalosporinas uma opção terapêutica largamente utilizada (PEREIRA *et al.*, 2003; QUEENAN *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2015).

As ESBLs são enzimas inicialmente transmitidas por plasmídios originárias na família Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA). Nos últimos anos houve o aparecimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES), provavelmente em decorrência de mutações dos genes anteriores. Com isso, mais de 300 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente, sendo a maioria derivada dos grupos TEM, SHV e CTX-M, com 150, 88 e 69 variantes, respectivamente (DALMARCO, BLATT, CORDOVA, 2006; VERDI *et al.*, 2016).

As enzimas CTX-M são as ESBLs predominantemente produzidas pelas enterobactérias, dentre elas *K. pneumoniae* possui uma alta quantidade de cepas produtoras de CTX-M. Existem mais de 50 tipos diferentes da enzima que podem ser divididas em 5 grupos com base em suas identidades de aminoácidos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25. Esta enzima não está restrita ao ambiente hospitalar, como demonstra um estudo realizado por Schill *et al.*, que detectou a presença de CTX-M em bactérias presentes na carne de porco fresca (PITOUT, LAUPLAND, 2008; SCHILL *et al.*, 2017).

Jarlier *et al.* (1988), descreveu pela primeira vez a detecção fenotípica de ESBL aplicando o teste de sinergismo do duplo disco de antimicrobianos utilizando um disco de amoxicilina 20 µg mais 10 µg de clavulanato central e demais discos com distâncias de 30mm de centro a centro, onde o aparecimento de uma zona fantasma ou distorção do halo ao redor do disco betalactâmico indica uma amostra produtora de ESBL (JARLIER, 1988).

Posteriormente, Sirot *et al.* (1996), utilizou discos de cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e aztreonam (ATM) colocados ao redor de um disco de amoxicilina mais clavulanato utilizando as mesmas distâncias anteriores, com resultados confiáveis.

Essa metodologia de detecção de ESBL passou a ser utilizada frequentemente nos laboratórios de microbiologia por ser uma técnica de baixo custo, fácil execução e com resultados confiáveis, entretanto não há um consenso quanto as distâncias padronizadas entre os discos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a utilização da distância de 30 mm (de centro a centro) disco de amoxicilina com ácido clavulânico em relação aos outros discos de betalactâmicos (SOUSA JUNIOR *et al.*, 2004).

Por outro lado, o documento lançado pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCast), segue os padrões adotados na Europa, se baseando no documento da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast)* que diz que a distância ótima entre os discos é de 20 mm (de centro a centro dos discos de difusão), podendo ser aumentada para 30 e diminuída para 15 mm (BRASIL, 2017).

Esse trabalho tem como objetivo avaliar até que distâncias de centro a centro dos discos de difusão podem ser utilizadas na rotina laboratorial na detecção fenotípica de ESBL por teste de sinergismo por disco duplo (TSDD) utilizando a cepa *American Type Culture Collection (ATCC™)* de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra bacteriana

Foi utilizado uma cepa de ATCC™ de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, de acordo com o recomendado pelo BrCAST. A cepa com a numeração 700603 pertencente à microteca do Laboratório de Análises Clínicas da Uningá- Centro Universitário Ingá foi semeada em ágar *Muller Hinton* (MHA), sendo incubada em estufa de aerobiose a 37°C e o tempo de incubação foi de 18 a 24 horas.

Padronização do inóculo

Foi preparada uma suspensão com a cepa ATCC™ 700603 em *Mueller Hinton Broth* (MHB) com turvação no padrão de 0,5 na escala de *McFarland*. Após homogeneização desta suspensão foi realizada semeadura nas placas de petri contendo MHA com 4mm de espessura, foram adicionados os discos de difusão utilizando técnica asséptica.

Metodologia do teste de sinergismo de duplo disco

A metodologia utilizada foi o teste de sinergismo de duplo disco (TSDD), onde foi utilizado um disco de ceftazidima com ácido clavulânico 30/10 µg, situado ao centro da placa; os demais antibióticos empregados, foram dispostos nas diferentes distâncias testadas e aplicados sobre a placa de petri contendo MHA, as placas foram incubadas em estufa de aerobiose a 37°C e a leitura foi realizado após 24 horas (JARLIER, 1988).

Os discos de antimicrobianos que foram usados: ceftazidima 30 µg, aztreonam 30 µg, ceftriaxona 30 µg e cefuroxima 30 µg. As distâncias testadas foram escolhidas aleatoriamente e os testes foram suspensos quando obtidos dois resultados negativos consecutivos, 1,8 cm, 1,9 cm, 2,0 cm, 2,2 cm, 2,3 cm, 2,4 cm, 2,9 cm, 3,2 cm, 3,4 cm, 3,5 cm e 3,6 cm.

Foram considerados positivos as distâncias testadas quando observado uma ampliação do halo de inibição em alguma das cefalosporinas ou do aztreonam, ou o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição em uma das drogas betalactâmicas, que é denominada de zona fantasma.

A metodologia do TSDD utiliza o sinergismo dos antibióticos difundidos no MHA para que ocorra o aparecimento desta área fantasma, entretanto esse sinergismo pode apresentar resultados falsos quando a distância entre os disco contendo os fármacos é maior do que a capacidade de difusão do antimicrobiano no MHA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

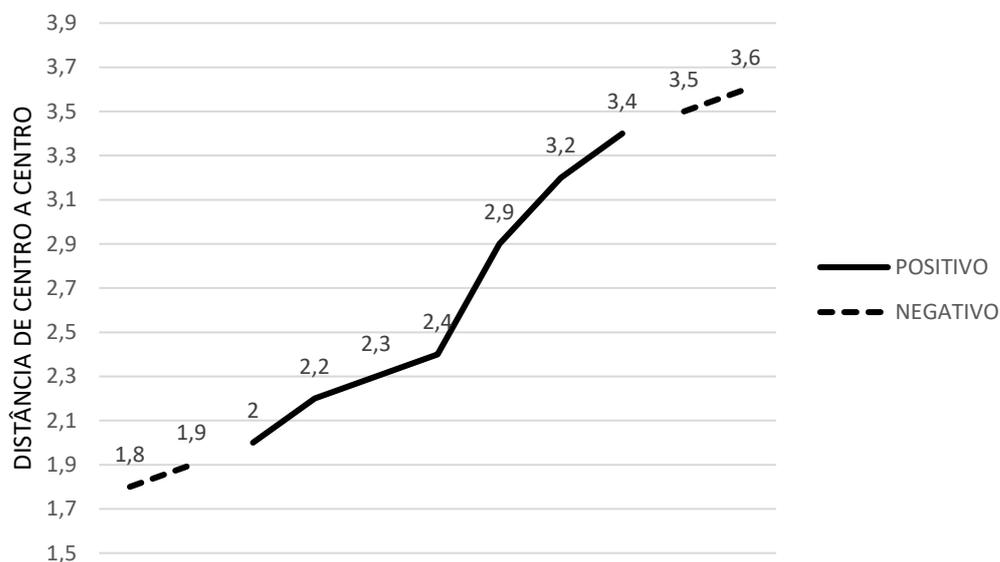
Conforme a figura 1, podemos verificar as distâncias de centro a centro testadas e os resultados obtidos.

Podemos observar que nas distâncias de 1,8 e 1,9 cm não houve sinergismo e essa porcentagem foi de 18%; a mesma porcentagem encontrada nas distâncias de 3,5 cm e 3,6 cm, onde de igual maneira não houve a formação da zona fantasma.

Nas demais distâncias: 2,0 cm, 2,2 cm, 2,3 cm, 2,4 cm, 2,9 cm, 3,2 cm e 3,4 cm pode-se visualizar a formação da zona fantasma, indicando ESBL

positivo, totalizando 45% de positividade nas distâncias testadas de centro a centro.

Figura 1 - Resultados obtidos com teste de sinergismo por disco duplo para a presença da zona fantasma.



Fonte: os autores.

O princípio básico do método de difusão consiste no disco impregnado com o antimicrobiano que entra em contato com a superfície úmida do ágar, a água é absorvida no papel de filtro e o antibiótico se difunde no meio circundante (JUNIOR, FERREIRA, CONCEIÇÃO, 2004; LINCOPAN, SILVA, 2012)

Nossos resultados (figura 2) demonstraram uma flexibilidade para valores maiores do que 30 mm entre os discos, diferentemente do que recomenda a ANVISA e EUCAST, já que ambos comitês orientam que a distância máxima a ser usada seja 30 mm; a agência brasileira não sugere variação nesta distância, já o comitê europeu admite esta distância como limite máximo (BRASIL, 2017).

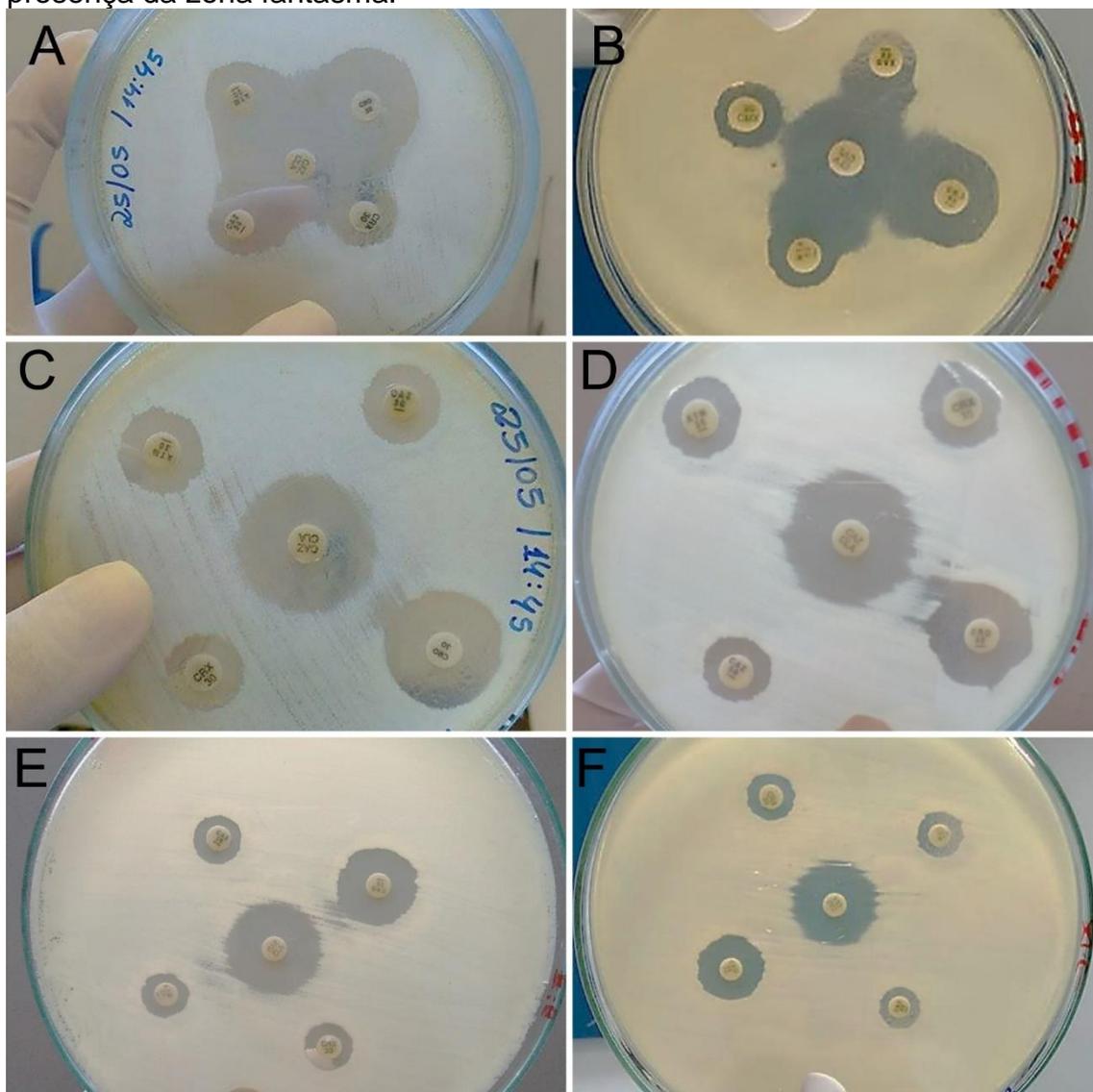
O BrCAST admite ainda que a distância mínima a ser utilizada pode ser utilizada é de 15 mm, nossos dados não confirmaram esta distância. As placas em que a medida foi menor do que 20 mm, não foi possível verificar a formação da zona fantasma (BRASIL, 2017).

O método TSDD para a confirmação do fenótipo de ESBL, é a técnica mais utilizada no laboratório de análises clínicas, pois apresenta baixo custo, fácil acesso à metodologia e pelo tempo de obtenção dos resultados, é de fácil realização e acessível a qualquer laboratório. Porém, os métodos fenotípicos não são capazes para distinguir entre as enzimas específicas responsáveis para a produção ESBL; A cepa ATCC utilizada nos experimentos, é produtora de ESBL do tipo SHV-18, no entanto nenhuma diferença ou alteração é visível ao teste fenotípico quanto a qual classe genotípica pertence (JUNIOR, FERREIRA, CONCEIÇÃO, 2004; PITOUT, LAUPLAND, 2008).

Algumas bactérias produtoras de ESBL, apresentam também o cromossomo AmpC, promovendo resistência às cefalosporinas de terceira geração que ocultam a presença de ESBL. Para um teste confirmatório de

betalactamase AmpC, é recomendado utilizar cefepima como indicadora, já que a cefalosporina de 4ª geração normalmente não é hidrolisada por betactamases Amp C (DRIEUX *et al.*, 2008; JACOBY, 2009; MUNIER *et al.*, 2010; THOMSON, 2010; POLSFUSS *et al.*, 2013).

Figura 2 – Resultados obtidos para distância centro a centro para detectar a presença da zona fantasma.



Notas: A - Distância centro a centro de 1,9 cm, não sendo possível detectar a presença da zona fantasma; B - Distância centro a centro de 2,0 cm demonstrando ESBL positivo, com a presença da zona fantasma; C - distância centro a centro de 2,5cm demonstrando ESBL positivo, com a presença da zona fantasma; D - Distância centro a centro de 2,9 cm demonstrando ESBL positivo, com a presença da zona fantasma; E - Distância centro a centro de 3,4 cm demonstrando ESBL positivo, com a presença da zona fantasma; F - Distância dentro a centro de 3,5cm ausência da zona fantasma.

Fonte: os autores

O método utilizado, deve ser cuidadosamente analisado por microbiologistas, pois em distâncias muito pequenas entre os discos, não é

possível a correta observação da formação de halos, podendo ser interpretado como um falso-negativo como aconteceu em nossos resultados para distâncias menores do que 20 mm. Na condição de distâncias maiores, após a difusão dos antimicrobianos no meio circundante, não ocorre o sinergismo. Sem o surgimento da zona fantasma, a interpretação pode ser equivocada.

Outros testes podem ser utilizados também para a detecção de ESBL, como por exemplo E-teste que utiliza uma fita plástica contendo concentrações crescentes do agente em estudo. Em um dos lados da fita existe ceftazidima, e do outro ceftazidima associada a uma concentração fixa de 2µg/mL de ácido clavulânico. Também é uma técnica de fácil realização; entretanto, pode gerar resultados confusos se usada isoladamente e como seu custo é elevado, não apresenta vantagens suficientes para seu uso (JUNIOR *et al.*, 2004).

A detecção de ESBLs também pode ser realizada utilizando métodos moleculares como *Polymerase Chain Reaction*, reação da cadeia da polimerase (PCR) baseada na amplificação do DNA. Entretanto esse método requer aumento de gastos, e aparelhos específicos, sendo então realizados somente por laboratórios de grande porte e centros de referência. As vantagens das técnicas moleculares incluem sensibilidade, especificidade e segurança (JUNIOR *et al.*, 2004; LIVERMORE, 2012; MURRAY *et al.*, 2014).

O meio cromogênico seletivo também pode ser utilizado, indicado para uma rápida detecção de bactérias gram-negativas, produtoras de ESBL. São placas descartáveis contendo o meio de cultura com a mistura cromogênica. De acordo com cada bactéria semeada, produz uma coloração diferenciada. A *K. pneumoniae* será caracterizada por colônias azuis metálicas (Chromagar ESBL).

Um estudo realizado por Paterson *et al.*, verificou o uso de cefalosporinas em bacteremias associadas a *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e a terapia antimicrobiana utilizada no tratamento. A Tabela 1, demonstra que 6 pacientes estavam sendo tratados com cefalosporinas de terceira geração; e dois com de quarta geração, ressaltando a importância da detecção de cepas produtoras de ESBL, pois o retardo no diagnóstico pode prejudicar o tratamento pois muitos hospitais têm como protocolo empírico o uso de cefalosporinas (PATERSON *et al.*, 2001).

Na Tabela 1, podemos constatar que o uso de cefalosporinas de terceira geração em cepas produtoras ESBL resultaram em falha terapêutica e consequente morte em dois casos dos três que persistiram na terapia; em um caso teve cura, mas com posterior recaída. No caso do cefepime, uma cefalosporina de 4ª geração, houve um óbito e uma cura. Nos demais casos o sucesso terapêutico se deu pela troca da classe antimicrobiana pelos carbapenêmicos imipenem e meropenem que não sofrem a ação das ESBL, o que reitera a importância do diagnóstico correto para salvar vidas (PATERSON *et al.*, 2001).

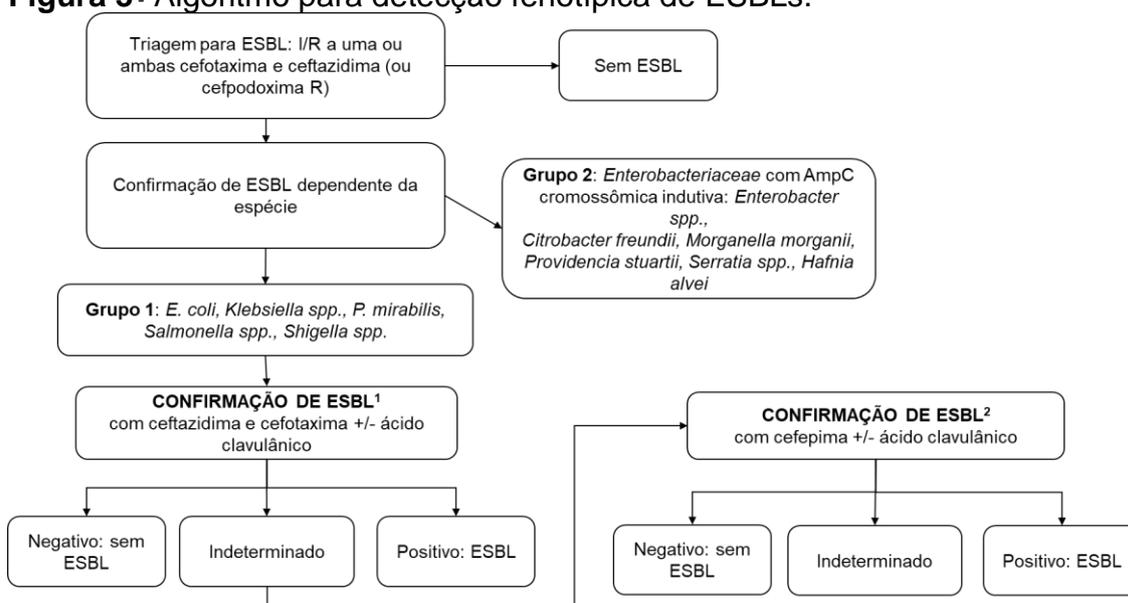
O microbiologista deve estar atento durante a identificação de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e utilizar cefalosporinas indicadoras como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima no antibiograma e quando a interpretação quanto ao ponto de corte for de resistente ou intermediária, fazer a confirmação fenotípica para estes casos conforme a Figura 3 (BRASIL, 2017).

Tabela 1 - Uso de cefalosporinas no tratamento de bacteremia por cepas de *K. pneumoniae* ESBL positiva.

Paciente Idade e gênero Doença de base	Tipo de Infecção	Tipo de ESBL	Antibiótico utilizado no tratamento	Resultado
72, M Hematoma intracerebral	Pneumonia associada a ventilação	TEM SHV	Ceftazidima	Falha; febre contínua apesar de 2 dias de ceftazidima; mudou para imipenem com cura
76, M Hipertensão	CVL relacionado	SHV	Ceftriaxona	Falha; Febre contínua apesar de 3 dias de ceftriaxona; mudou para imipenem mas morreu no 14 ^o dia de terapia
58, M Cirrose	Pneumonia nosocomial (sem ventilação)	SHV SHV	Ceftriaxona	Falha; morreu (recebeu 48 h de terapia)
39, M Cirurgia abdominal	Infecção CVL	SHV	Ceftriaxona	Falha; morreu recebeu 48 h de terapia
35, F Cesariana	Infecção de risco cirúrgico	TEM SHV	Cefotaxime	Falha; febre contínua após 72 h; mudou para meropenem com cura
49, M Cirrose	SBP	TEM SHV	Ceftriaxona	Cura; infecção resolvida, mas recaída com um novo Estirpe após a parada de antibióticos
73, F Neurocirurgia	Pneumonia associada a ventilação	TEM SHV	Cefepime	Cura
25, M Múltiplos traumas	Pneumonia associada a ventilação	SHV	Cefepime	Falha; morreu de sepsis apesar de 5 dias de terapia

Fonte: Paterson *et al.* (2001), adaptado.

Em métodos automatizados também é necessária a mesma atenção quanto a cefalosporinas indicadoras e é recomendado a confirmação manual pelo teste fenotípico conforme o diagrama acima.

Figura 3 - Algoritmo para detecção fenotípica de ESBLs.

Notas: ¹Caso a cefoxitina tenha sido testada e a CIM seja >8 mg/L, realizar teste confirmatório com cefepima +/- ácido clavulânico. ²Não pode ser determinado como positivo ou negativo (i.e. a fita não pode ser lida devido ao crescimento além da faixa de CIM da fita ou nenhum sinergismo evidente com o disco combinado e com o teste de sinergismo do duplo disco). Caso a confirmação com cefepima +/- ácido clavulânico seja indeterminada há necessidade de teste genotípico.

Fonte: BrCast (2013), adaptado

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é de grande importância a realização correta de testes laboratoriais para a detecção de ESBL, resultando no tratamento eficaz evitando que os pacientes possam evoluir a óbito. Nossos resultados apontam que as variações nas distâncias podem trazer resultados falso-negativo para valores maiores do que 34 mm e menores do que 20 mm. São necessários mais testes utilizando outras cepas de bactérias produtoras de ESBL e de genotipagem diferente para confirmação dos dados.

REFERÊNCIAS

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional da Vigilância Sanitária**. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audes/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 20 out 2017.

BrCAST - Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. **Orientações do BrCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. 2013. Acesso em: 21 out 2017.

Chromagar ESBL. Rio de Janeiro: Plast Labor. Bula de remédio.

COELHO, I. *et al.* Avaliação da suscetibilidade da *Klebsiella pneumoniae* aos betalactâmicos. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v. 5, n. 2, 2015.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, Table of Contents, 2009.

JARLIER, V. *et al.* Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 867-878, 1988.

JUNIOR, M. A. D. S.; FERREIRA, E. D. S.; CONCEIÇÃO, G. C. D. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2004.

KAVI, J. *et al.* Comment on: Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 246, 2013.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.1465.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

MUNIER, G. *et al.* Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -lactamases more often than to ESBLs. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 673-674, 2010.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2206-2212, 2001.

PEREIRA, A. D. S. *et al.* Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 301-308, 2003.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.

POLSFUSS, S. *et al.* Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1194-1204, 2012.

QUEENAN, A. M. *et al.* Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 269-275, 2004.

SCHILL, F. *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 58-66, 2017.

SILVA, K. C. D.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SIROT, J. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases by disk diffusion. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, s. 1, p. 35-39, 1996.

SOUZA, A. S. D.; TORRES, J. B.; OLIVEIRA, R. C. D. Identificação laboratorial de beta lactamases de espectro estendido (ESBLs) em espécimes clínicos de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 303-306, 2010.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

VERDI, C. M. *et al.* Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *klebsiella pneumoniae*: uma revisão. **Revista saúde integrada**, v. 9, n. 17, p. 16-27, 2016.