

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Graduação em Biotecnologia

GLEYCE HELLEN DE ALMEIDA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA E MOLECULAR DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL
PÚBLICO DE DOURADOS-MS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Dourados – MS

Abril/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Graduação em Biotecnologia

GLEYCE HELLEN DE ALMEIDA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA E MOLECULAR DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL
PÚBLICO DE DOURADOS-MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Simionatto

Co-orientadora: MSc. Kesia Esther da Silva

Dourados – MS

Abril /2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729c Souza, Gleyce Hellen De Almeida De
CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA E MOLECULAR DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE
DOURADOS-MS / Gleyce Hellen De Almeida De Souza -- Dourados: UFGD,
2016.
53f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Simone Simionatto
Co-orientador: Kesia Esther da Silva

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. Infecção hospitalar. 2. Resistência bacteriana. 3. Carbapenemases.. I.
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Gleyce Hellen de Almeida de Souza

**CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA E MOLECULAR DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE
DOURADOS-MS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:

Profª Drª Simone Simionatto

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Kelly Mari Pires de Oliveira

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Silvana Beutinger Marchioro

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências da Saúde

Dourados, 14 de Abril de 2016

Dedico a finalização desta etapa de minha vida, aos meus pais, Aide & Vanderli, por todo apoio, dedicação e amor incondicional...

Agradecimentos

Só tenho a agradecer!

A Deus pelo cuidado e amor para com a minha vida e a da minha família.

Aos meus pais, que tanto amo. Obrigada pelo amor e apoio incondicional. Sou extremamente grata a Deus, por ter tido a honra de ser fruto do amor de vocês. Espero que saibam que são meus maiores exemplos de vida, meus melhores amigos, meus eternos amores. Ao meu pai, que desde o meu primeiro sopro de vida esteve comigo, meu obrigada por ser um exemplo de honestidade, integridade e caráter. À minha mãe Aíde, a qual é o pilar da minha vida, obrigada pelo exemplo de dedicação, determinação e foco.

Ao meu irmão Vander pelo seu incentivo, amor, amizade e por estar junto a mim desde que eu me lembro.

A toda a minha família genética e de coração (Raquel, Toninho, Luyara, Antonio João, Micheli, Lucimar e Cláudio) que com muito amor e paciência me apoiaram, e me ajudaram a construir quem sou e a concretizar este sonho.

A minha orientadora, Prof. Dra. Simone Simionatto, pelo seu apoio, confiança, empenho, dedicação, incentivo e ensinamentos.

A minha co-orientadora Kesia Esther da Silva, pelas valiosas contribuições na construção deste trabalho.

A todos os professores que participaram da minha formação, os quais me ensinaram a buscar o conhecimento.

A Ruthe, Robson e Thaianne por serem meus melhores amigos. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, dicas, pelas aventuras, pelas risadas, por terem estado comigo nos melhores e piores momentos desta graduação. Sou grata por ter vocês.

Aos meus amigos e membros do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular de Microrganismos (Ruthe, Nani, SemiDeusa, Romário, Mariana, Laís, Amanda Colombo, Júlio, Peceu, Maria Lorenza, Pamela, Marcelo, Ronaldo, Kathleen, Maisa, Graciela e Letycia), os quais me acolheram e me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de Lar (Wellinton, Deborah, Jean, Natan e Hévila). Vocês transformaram um apartamento cheio de desconhecido em um casamento nada comum. Obrigada por estarem sempre ouvintes aos meus desabaços, frustrações, sonhos e conselhos. Obrigada pelas palavras de incentivo. Sempre terão lugar em meu coração.

A todos os meus amigos (as) pela amizade de sempre.

A todos aqueles que contribuíram para minha formação e fizeram de mim o que sou hoje.

A PROAE/UFGD, que ajuda milhares de estudantes que assim como eu, foram beneficiados com os auxílios concedidos.

Por fim, agradeço ao Clebson o qual é meu amor, parceiro, amigo, refúgio, a pessoa a qual escolhi amar. Obrigada, por cuidar de mim e ser meu maior incentivador em todos os momentos.

Meus mais sinceros agradecimentos ...

“Somos formados por milhares de pessoas. Cada ser que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou nos dito algumas palavras de conforto e encorajamento, influenciou em nossa personalidade e nossos atos. É por isso que elas se transformam em parte de qualquer sucesso nosso”.

George Matthew Adams

SUMÁRIO

Índice de siglas e abreviaturas	I
Índice de tabelas	II
Índice de figuras	III
Resumo	IV
Abstract.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Infecção hospitalar.....	16
2.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	17
2.3 Resistência bacteriana.....	18
2.4. Produção de β -lactamases.....	20
2.5 Carbapenemases	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. REFERÊNCIAS	24
5. ARTIGO – Caracterização fenotípica e molecular de Enterobactérias isoladas de um hospital público de Dourados-MS	32
6. ANEXOS	50
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	50
Anexo 2: Normas da Revista - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	51

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

bla – Genes das β -lactamase

CDC - Centers for Disease Control and Prevention / Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute* / Instituto de Padronização de Laboratório Clínico

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ESBL – β -lactamases de espectro estendido

GES - *Guiana extended spectrum*

IMI – *Imipenem hydrolyzing β -lactamase*

IMP – *Imipenemase*

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MBL – Metallo- β -lactamase

MHT – Modified Hodge Test / Teste Modificado de Hodge (TMH)

MIC – Minimum inhibitory concentration / Concentração Inibitória Mínima (CIM)

MS – Mato Grosso do Sul

NDM - *New Delhi metallo- β -lactamase*

NMC – *Not metalloenzyme carbapenemase*

OXA – Oxacilinase

PCR – Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase

SENTRY – *Antimicrobial Surveillance Program* / Programa de Vigilância Antimicrobiana

SME – *Serratia marcescens enzyme*

SPM - *São Paulo metallo- β -lactamase*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM - *Verona imipenemase*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Critérios utilizados para interpretação do CIM ($\mu\text{g/mL}$) como sensível, intermediário ou resistente, respectivamente, segundo preconização pelo CLSI (2015).....	35
Tabela II. Gene, sequências e temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	37
Tabela III. Dados clínicos das amostras bacterianas de <i>S. marcescens</i> e <i>K. pneumoniae</i>	38
Tabela IV. Resultado do Perfil de susceptibilidade das amostras bacterianas de <i>S. marcescens</i> e <i>K. pneumoniae</i> frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem, segundo preconização pelo CLSI (2015).....	39
Tabela V. Sensibilidade bacteriana aos carbapenêmicos avaliados pelo teste de Concentração Inibitória Mínima.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa dos principais mecanismos bacterianos de resistências aos antibióticos.....	19
Figura 2. Teste Modificado de Hodge utilizando o antibiótico ertapenem (10 µg/ml).....	40
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) com o resultado da amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{KPC-2} em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	40

RESUMO

Infecções causadas por enterobactérias produtoras de carbapenemases constituem um grave problema de saúde pública, devido ao seu alto potencial de disseminação e à resistência a múltiplas drogas, o que leva a limitação das opções terapêuticas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a caracterização molecular de cepas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados-MS, durante junho de 2013 a novembro de 2014. A identificação das espécies bacterianas foi realizada através do sistema automatizado Vitek^{®2} (BioMérieux). O perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) foi avaliado pelo teste de microdiluição em caldo Mueller Hinton para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os isolados resistentes foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge (TMH) para triagem da produção das carbapenemases. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada visando identificar a presença de genes codificadores das carbapenemases (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{NDM-1}). Obteve-se 66 isolados de enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae* (n=56; 85%) e *Serratia marcescens* (n=10; 15%). Com a análise dos dados clínicos foi possível identificar que 59% das cepas foram isoladas de *swab* retal, sendo que 54.5% dos pacientes estavam internados em Unidades de Terapia Intensiva Adulto. A maioria dos isolados era proveniente de pacientes do sexo masculino (64%) e com idade entre 66 a 85 anos (36%). Na determinação da CIM, 86.5% foram resistentes ao imipenem, 80.5% ao ertapenem e 79% ao meropenem. No TMH, 8 isolados de *S. marcescens* (80%) e 42 isolados de *K. pneumoniae* (75%) foram classificadas como produtoras de carbapenemases. A PCR demonstrou que o gene *bla*_{KPC-2} estava presente em todas os isolados de *S. marcescens* e em 35 isolados (62.5%) de *K. pneumoniae*. A presença dos demais genes pesquisados não foi evidenciada. Com estes resultados é possível identificar um elevado número de isolados de *S. marcescens* e *K. pneumoniae* produtoras da KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) neste hospital. Sendo assim, a elaboração de medidas de controle é de extrema importância para a redução da infecção hospitalar.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, resistência bacteriana, carbapenemases.

ABSTRACT

Infections caused by carbapenemases-producing enterobacteria are a serious public health problem, due to its high potential of spreading and multidrug resistance, leading to limitation of therapeutic options. Thus, the aim of this study was to evaluate the profile of antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Enterobacteriaceae* strains resistant to carbapenems, which were isolated from patients in a public hospital in Dourados-MS during June 2013 to November 2014. The identification of bacterial species was performed using the automated system Vitek®2 (BioMérieux). The profile of susceptibility to carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem) was evaluated by microdilution test with Mueller Hinton broth to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The resistant strains were subjected to the Modified Hodge Test (MHT) for screening of carbapenemases production. The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to identify the presence of genes encoding carbapenemases (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{NDM-1}). It were isolated 66 strains of *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae* (n = 56; 85%) and *Serratia marcescens* (n= 10; 15%). With the analysis of clinical data, it was possible to identify that 59% of the strains were isolated from rectal swab, and 54.5% of these patients were admitted to the Adult Intensive Care Units. Most of the strains were from male patients (64%) and aged 66-85 years (36%). In the MIC determination, 86.5% were resistant to imipenem, 80.5% to ertapenem, and 79% to meropenem. In the MHT, 8 strains of *S. marcescens* (80%) and 42 strains of *K. pneumoniae* (75%) were classified as carbapenemases producers. The PCR demonstrated that *bla*_{KPC-2} gene was present in all strains of *S. marcescens* and 35 strains (62.5%) of *K. pneumoniae*. The presence of the other genes of this study was not found. With these results it is possible identify a large number of strains of *S. marcescens* and *K. pneumoniae* producing KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) in this hospital. Therefore, the development of control measures is extremely important to hospital infection reduction.

Keywords: Nosocomial infection, bacterial resistance, carbapenemases.

1. INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência a saúde, somado ao surgimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos representam um importante problema de saúde pública mundial, uma vez que apresenta impacto sobre a letalidade hospitalar, tempo de internação do paciente e no aumento dos custos assistenciais (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; FIGUEIREDO et al., 2013).

Entre as principais bactérias que adquirem resistência a antimicrobianos atualmente, está a família *Enterobacteriaceae*, as quais se tornaram um dos principais grupos de patógenos se tratando de infecções hospitalares (KUMARASAMY et al., 2010). As bactérias desta família são importantes causas de infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea, pneumonias e infecções intra-abdominais (PITOUT, 2010). Nesta família vários gêneros têm importância clínica, no entanto espécies como *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *K. pneumoniae* são frequentemente descritas nos ambientes hospitalares (KONEMAN et al., 2006).

Para o tratamento de infecções causadas por Enterobactérias, os antibióticos β -lactâmicos (cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) constituem as principais escolhas terapêuticas (COQUE, 2008). No entanto, a utilização destes antibióticos na clínica médica está comprometida, uma vez que houve um aumento nas taxas de resistência às cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, devido à disseminação de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (SADER et al., 2004).

Dessa forma, houve um aumento no uso terapêutico de antibióticos carbapenêmicos, já que estes constituem uma das últimas escolhas para tratamento de infecções graves causadas por microrganismos multirresistentes produtores de ESBL (LASCOLS et al., 2012). Porém, os índices de resistência a carbapenêmicos têm aumentado de forma proporcional ao seu uso, como uma resposta adaptativa das bactérias e muitas vezes como consequência do seu uso indiscriminado (NETO et al., 2007).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de enzimas carbapenemases é o mais comum e importante na família *Enterobacteriaceae* (PAVEZ, 2009; ANVISA, 2013; CORREA et al., 2013). As carbapenemases

representam a família enzimática mais versátil dentre as β -lactamases, em razão da sua ampla atividade hidrolítica contra todos os β -lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). As carbapenemases com maior relevância clínica são *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), oxacilinases (OXA) e metalo- β -lactamases (que inclui os tipos *Verona imipenemase* (VIM), *Imipenemase* (IMP) e *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM) (LASCOLS et al., 2012; PLACON, 2014).

Com a disseminação de bactérias capazes de hidrolisar β -lactâmicos, as opções terapêuticas ficaram restritas. O perfil de resistência varia de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes, doenças subjacentes e o uso de antimicrobianos (NOGUEIRA et al., 2014). Desta forma, o conhecimento do perfil epidemiológico dos isolados bacterianos circulantes nos hospitais é um fator primordial na contenção da disseminação da resistência e, conseqüentemente, no controle das infecções hospitalares.

Buscando contribuir nesta linha, este estudo teve como objetivo identificar genes de resistência a carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas de pacientes internados em um hospital público no município de Dourados/MS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção hospitalar

A infecção hospitalar é definida pelo Ministério da Saúde, conforme a Portaria nº 2616 de 12/05/1998 como “infecção adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares” (BRASIL, 1998). A aquisição destas infecções é um dos principais determinantes no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, nos custos diretos e indiretos associados à assistência à saúde e do prolongamento do tempo de internação do paciente, constituindo um fardo social e econômico significativo tanto para os pacientes quanto para o sistema de saúde (ANVISA, 2004; OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; FIGUEIREDO et al., 2013).

No Brasil, as infecções hospitalares estão entre as principais causas de óbito, ao lado das doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças respiratórias e as doenças transmissíveis (NOGUEIRA et al., 2009). Estima-se que no Brasil de 5% a 15% dos pacientes internados contraem algum tipo de infecção hospitalar, o que causa um acréscimo de 5 a 10 dias em média ao período de internação do paciente, e aumento nos gastos relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos (MACHADO et al., 2001).

Vários fatores de risco podem estar correlacionados ao aumento da ocorrência de infecções hospitalares, como a gravidade da condição clínica do paciente, tempo de permanência do paciente no hospital, condições imunológicas, presença de comorbidades (câncer, AIDS, doenças autoimunes), utilização de imunossuppressores e/ou antibióticos, tempo de exposição a medicamentos, procedimentos e dispositivos invasivos, condições nutricionais do paciente, idade e características físicas do hospital (FERRAREZE, 2007; SANTOS, 2004) e até cirurgias (SILVA, et al., 2016).

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adquirem infecções em uma frequência muito superior aos demais, sendo expostos a um risco de 5 a 10 vezes maior (WEBER et al., 1999).

No ambiente hospitalar, dentre as bactérias Gram-negativas com papel importante nos quadros infecciosos, está a família *Enterobacteriaceae*, representando o grupo de patógenos mais comuns em ambientes hospitalares (NORDMANN et al., 2011).

2.2 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* envolve microrganismos ubíquos e constituintes da microbiota intestinal normal da maioria dos animais, inclusive dos seres humanos (TRABULSI, et al., 2002). Os membros dessa família são bastonetes Gram-negativos, podendo ser dotados de flagelos peritríquios ou imóveis, não formam esporos e podem crescer rapidamente em condições aeróbias ou anaeróbias, e em uma variedade de meios de cultura. Esses microrganismos possuem exigências nutricionais simples, fermentam glicose, reduzem o nitrato, são catalase-positivas e oxidase-negativas (O'HARA, 2005).

Distribuem-se em mais de 40 gêneros com quase 200 espécies (JANDA; ABBOTT, 2006). Os principais gêneros da família responsáveis por infecções clínicas são: *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. e *Morganella* spp. (BENTO, 1997; BRATU et al., 2005).

Apesar de um número relevante de gêneros envolvidos em doenças humanas, espécies como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *K. pneumoniae* são as mais descritas nos ambientes hospitalares (KONEMAN et al., 2006). Essas bactérias são responsáveis por cerca de 70% das infecções do trato urinário e 50% das septicemias (ANVISA, 2004a), podendo também causar infecções da corrente sanguínea, infecções do trato respiratório, gastrointestinal, pneumonias, bacteremias, meningites, dentre outras (PATERSON, 2006; PITOUT, 2010). Neste trabalho, dentre os membros da família *Enterobacteriaceae*, a maioria dos isolados bacterianos com resistência a carbapenêmicos recuperados no hospital em estudo eram das espécies: *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*.

Bactérias do gênero *Serratia* spp. representam um grupo de microrganismos oportunistas e sua espécie mais importante clinicamente é *Serratia marcescens* (BAYRAMOGLU et al., 2011), a qual é responsável por uma grande porcentagem de infecções hospitalares e geralmente está associada a uma variedade de infecções humanas, em particular da corrente sanguínea, do trato respiratório e urinário e na septicemia (MENEZES, 2004). A mortalidade de pacientes com infecções em UTI causadas por *S. marcescens* variam de 14% a 100% (MILISAVLJEVIC et al, 2004; ARSLAN et al, 2010; SILVA et al., 2015).

O gênero *Klebsiella* spp. representam patógenos oportunistas que causam infecções do trato urinário, infecções respiratórias, infecções intra-abdominais, septicemia e bacteremias (KONEMAN et al., 2006). Dados divulgados pelo Centers for Disease Control and Prevention, descreveram *Klebsiella* spp. dentre os dez principais agentes patogênicos relacionados com as infecções hospitalares nos Estados Unidos (HIDRON et al., 2008). Já na América Latina *K. pneumoniae* está entre os cinco patógenos mais frequentes em infecções hospitalares (SADER et al., 2004). São responsáveis por altas taxas de mortalidade podendo variar de 19,3% a 47,2 % (SILVA et al., 2016).

A emergência de enterobactérias resistentes a múltiplas drogas constitui um problema global e emergente a saúde, uma vez que as opções terapêuticas tornam-se limitadas e deste modo diminui-se as chances de sucesso terapêutico no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (MEYER; PICOLI, 2011).

2.3 Resistência bacteriana

A resistência antimicrobiana é definida como a capacidade de um microrganismo de interromper um determinado agente antimicrobiano, resultando assim em tratamentos ineficazes e infecções persistentes (WHO, 2012). A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, representou um dos grandes avanços na medicina para o tratamento das doenças infecciosas (BERTONCHELI; HORNER, 2008). Contudo, desde a introdução das penicilinas na clínica médica, a resistência bacteriana aos mais diversos agentes antimicrobianos vem aumentando exponencialmente (POWERS, 2004). A Organização Mundial de Saúde (2000) classificou a resistência aos antibióticos como uma das três maiores ameaças à saúde pública do século 21.

A resistência aos antimicrobianos podem ser dividida em resistência intrínseca ou adquirida (FERREIRA; SOUZA, 2000). A resistência intrínseca, também dita resistência natural, faz parte da herança genética e está associada aos genes cromossômicos (HARBOTTLE et al., 2006). A resistência adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível a droga, resultante da mutação de genes reguladores ou estruturais, sendo que a aquisição destes genes de resistência faz-se, muitas vezes, através de elementos móveis, tais como

plasmídeos, transposons ou integrons (FERREIRA; SOUZA, 2000; HARBOTTLE et al., 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) constituem o grupo de antibacterianos mais utilizados na clínica médica para o tratamento de infecções hospitalares, sobretudo em *Enterobacteriaceae* (COQUE, 2008; LASCOLS et al., 2012), sendo uma classe de elevada importância devido à sua baixa toxicidade e a sua eficácia terapêutica no tratamento de infecções (SUAREZ; GUDIOL, 2009). Os β -lactâmicos possuem em sua estrutura um anel β -lactâmico. Nos últimos anos a resistência a estes compostos tem sido progressivamente relatada e a emergência de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos tornou-se um problema mundial (PFEIFER, 2010).

Relatos do estudo multicêntrico realizado pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana (SENTRY) demonstraram que no Brasil e nos países da América Latina, em razão da grande disseminação na produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), as Enterobactérias estão com altas taxas de resistência às cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e monobactâmicos (SADER et al., 2004). A resistência aos antibióticos β -lactâmicos se dá por quatro principais mecanismos, como: alteração no sítio de ação do antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana externa pela alteração na expressão de porinas, aumento da expressão de bombas de efluxo, a produção de enzimas β -lactamases, sendo este o mais comum e de maior importância (Figura 1) (MEDEIROS, 1997; BUSH; JACOBY, 2010; ALVES; BEHAR, 2013; NOGUEIRA et al., 2014).

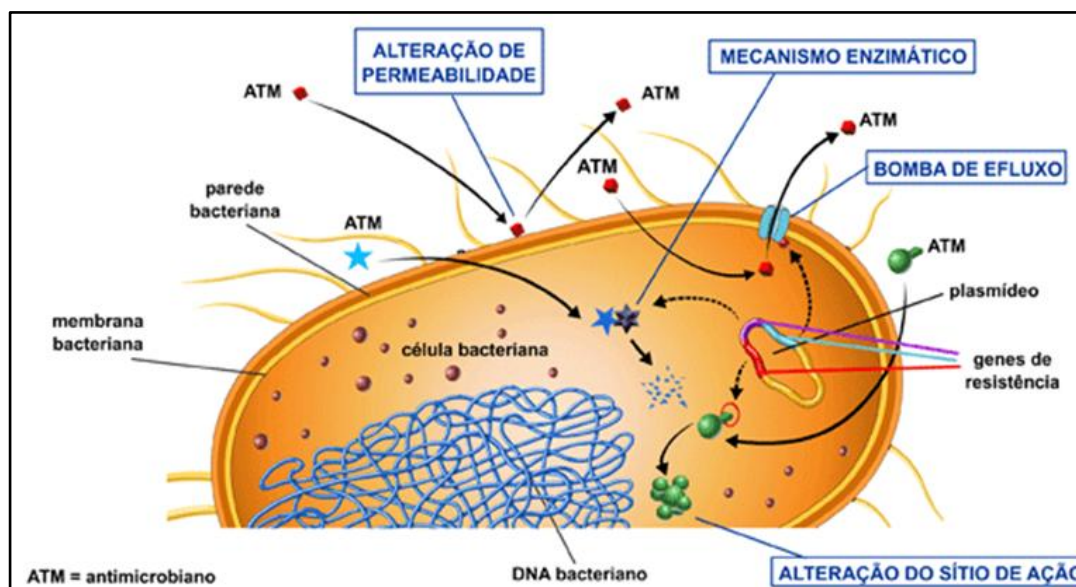


Figura 1. Imagem ilustrativa dos principais mecanismos de resistências aos

antibióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere_rm/cursos/rm_controlere_opas_web/modulo3/pop_mecanismo.htm.

2.4 Produção de β -lactamases

A hidrólise de antimicrobianos β -lactâmicos pela produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comumente utilizada pelas bactérias Gram-negativas de importância clínica (NOYAL, et al., 2009). Essas enzimas promovem a degradação do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo que ele apresente atividade (SEIBERT et al., 2014). A atividade dessas enzimas e sua capacidade de conferir resistência a um determinado antimicrobiano dependem da localização da β -lactamase, da quantidade produzida, das condições do meio para atividade enzimática e também da velocidade com que degrada o antimicrobiano (LIVERMORE, 1995).

Atualmente, já são conhecidas mais de 900 β -lactamases (<<http://www.lahey.org/studies/>>), devido ao grande número de β -lactamases descobertas, várias classificações ao longo do tempo foram propostas a fim de agrupá-las, sendo que há duas abordagens principais e estas serão descritas a seguir.

A classificação molecular proposta por Ambler é baseada na similaridade entre as sequências de aminoácidos. Nesta classificação quatro classes moleculares foram descritas e identificadas como classes A, B, C e D: Na classe A, estão incluídas as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbapenemases do tipo serina, como as KPCs. Na classe B, as metalo- β -lactamases (MBLs), na classe C, encontra-se as cefalosporinas (AmpC) e na classe D, as oxacilinas (AMBLER et al., 1991).

A classificação funcional de Bush-Jacoby (2010) baseia-se na similaridade funcional das enzimas incluídas em cada grupo da classificação de Ambler. E dividem as β -lactamases em três grupos principais: Grupo 1, corresponde ao grupo das cefalosporinas, pertencem a classe C de Ambler; grupo 2, formado pelas enzimas pertencentes ao grupo A e D de Ambler e as ESBL; e o grupo 3, constituído pelas enzimas MBLs, que pertencem a classe B de Ambler (BUSH; JACOBY, 2010).

As β -lactamases de maior preocupação para a clínica médica são as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases (ALVES; BEHAR, 2013).

2.5 Carbapenemases

As carbapenemases são enzimas que constituem o grupo mais versátil dentre as β -lactamases, tendo espectro de atividade mais amplo que as ESBL, pois são capazes de hidrolisar não só carbapenêmicos, mas também todos os β -lactâmicos, tais como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007; ALVES; BEHAR, 2013; PLACON, 2014).

A primeira carbapenemase foi descrita na França, no ano de 1993, e desde então, uma série de carbapenemases proliferou gerando uma grande preocupação terapêutica e epidemiológica, devido a restrições em opções de tratamento do paciente e estratégias de controle de infecção (EL-HERTE et al., 2012).

A produção de carbapenemases ocorre frequentemente em bactérias Gram-negativas (NORDMANN et al., 2012). As principais carbapenemases descritas pertencem às classes moleculares: A, que inclui as famílias serino-carbapenemases KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), IMI (*Imipenem hydrolyzing β -lactamase*), SME (*Serratia marcescens enzyme*), NMC (*Not metalloenzyme carbapenemase*) e GES (*Guiana extended spectrum*); classe B, metalo- β -lactamases (MBL), que incluem as famílias das β -lactamases VIM (*Verona imipenemase*), IMP (*Imipenemase*), SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*) e NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*); e classe D, que inclui as OXA-carbapenemases, onde a mais frequentemente detectada em enterobactérias é a OXA-48 (THOMSON, 2010; POURNARAS et al., 2010; PLACON, 2014).

A KPC é considerada a enzima com maior importância clínica e epidemiológica dentre as carbapenemases, sendo frequentemente descrita em *K. pneumoniae*, porém há relatos da produção dessas enzimas em outras espécies, como *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (PAVEZ, 2009; ANDERSON et al., 2007; QUEENAN; BUSH, 2007).

A KPC é classificada fenotipicamente no Grupo 2 de Bush e no Grupo A de Ambler (SAMRA et al., 2007). São codificadas pelo gene *bla*_{KPC} o qual é localizado em um plasmídio móvel, o que facilita a transferência do gene inter-espécies e, conseqüentemente, acentua seu potencial de disseminação (BURNS et al., 2011; CORREA et al., 2013). O primeiro relato da KPC ocorreu no estado da Carolina do

Norte, nos Estados Unidos, em 1996, em um isolado clínico de *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001). No entanto, no decorrer dos anos, passou a ser identificada em diversos patógenos e disseminou-se em vários países (KITCHEL et al., 2009; CUZON et al., 2010; SOARES et al., 2012). No Brasil, o primeiro relato de isolados produtores da KPC ocorreu em 2009, em cepas de *K. pneumoniae* em Recife/PE (MONTEIRO, 2009). Desde então, vários estados brasileiros vem descrevendo o surgimento desta enzima, sendo que em 2010 foi o primeiro relato no estado de Mato Grosso do Sul (CHANG et al., 2013). Existem 12 variantes da KPC (KPC-2 a KPC-13) descritas (www.lahey.org.studies), sendo as KPC-2 e KPC-3 mais frequentes (NORDMANN et al., 2009).

Bactérias produtoras da KPC são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, e podem apresentar resistência também a uma ampla gama de antibióticos não β -lactâmicos, o que ocasiona a limitação das opções terapêuticas no tratamento de infecções ocasionadas por essas bactérias (FALAGAS et al., 2011). Dessa forma, restringir a disseminação de cepas produtoras de carbapenemases passou a ser uma prioridade no contexto de controle de infecção hospitalar (PLACON, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar os mecanismos moleculares de resistência a carbapenêmicos em Enterobactérias resistentes isoladas de pacientes internados em um hospital público no município de Dourados/MS, buscando contribuir nas medidas de controle de infecção hospitalar.

3.2. Objetivos específicos

Identificar isolados de Enterobactérias produtoras de carbapenemases em amostras clínicas de pacientes internados em um hospital público de Dourados-MS;

Identificar a produção de carbapenemases através do Teste Modificado de Hodge;

Avaliar o perfil de susceptibilidade a carbapenêmicos através da técnica de microdiluição em caldo;

Identificar os genes produtores de carbapenemases através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4. REFERÊNCIAS

ALVES, A.P; BEHAR, P.R.P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v.57, n.3, p.213-218, 2013.

AMBLER, R.P; COULSON, A.F.W; FRERE, J.M. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**, v.276, n.1, p.269-270, 1991.

ANDERSON, K.F; LONSWAY, D.R.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.8, p.2723-2725, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Manual de Microbiologia Clínica**, 2004.

ANVISA. **Nota Técnica Nº 01/2013**. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes, 2013.

ARSLAN, U.; ERAYMAN, I.; KIRDAR, S.; YUKSEKKAYA, S.; CIMEN, O.; TUNCER, I.; BOZDOGAN, B. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. **Pediatrics International**, v.52, n.2, p.208–212, 2010.

BAYRAMOGLU, G.; BURUK, K.; DINC, U.; MUTLU, M.; YILMAZ, G.; ASLAN, Y. Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.44, n.2, p.111-115, 2011.

BENTO, Farah Solange. **DNA - Segredos & Mistérios**. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997.

BERTONCHELI, C.M; HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- β lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.44, n.4, p.577-599, 2008.

BRASIL. **Portaria 2616/MS/GM, de 12 de Maio de 1998**. Brasília: Diário Oficial da União, 1998.

BRATU, S; LANDMAN, D; ALAM, M; TOLENTINO, E; QUALE, J. Detection of KPC

carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.2, p.776-778, 2005.

BURNS, K; MORRIS, D; MURCHAN, S; et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey. **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 1, p.71-73, 2011.

BUSH, K; JACOBY, G.A. Update functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p.3969-3976, 2010.

CHANG, M.R; BIBERG, C.A; LOPES, F.A; TETILA, A.F.; PIGNATARI, A.C. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla_{KPC} gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.1, p. 114-115, 2013.

COQUE, T. M. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.2, p.195-200, 2008.

CORREA, L.; MARTINO, M.D.V.; SIQUEIRA I.; PASTERNAK, J.; GALES A.C.; SILVA, C.V.; CAMARGO, T.Z.S.; SCHERER, P.F.; MARRA, A.R. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n.1, p.80-88, 2013.

CUZON, G; NAAS, T; TRUONG, H; VILLEGAS, M.V.; WISELL, K.T.; CARMELI, Y.; GALES, A.C.; VENEZIA, S.N.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase bla_{KPC-2} gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.9, p.1349-1356, 2010.

EL-HERTE, R.I; KANJ, S.S. The threat of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Lebanon: an update on the regional and local epidemiology. **Journal of Infection and Public Health**, v.5, n.3, p.233–243, 2012.

FALAGAS, M.E; KARAGEORGOPOULOS, D.E; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing

enzymes. **Future Microbiology**, v.6, n.6, p.653-666, 2011.

FERRAREZE M.V.G; LEOPOLDO V.C; ANDRADE D.; SILVA M.F.I; HAAS V.J. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que precedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v.20, n.1, p.7-11, 2007.

FERREIRA, W.F.C; SOUZA, J.C. **Microbiologia**. Porto, Edição Lidel, v.2, 2000.

FIGUEIREDO, D.A; VIANNA, R.P.T ; NASCIMENTO, J.A . Epidemiologia da Infecção Hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Público Municipal de João Pessoa-PB. **Revista Brasileira Ciências da Saúde**, v.17, n.3, p.233-240, 2013.

HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D.G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v.17, n.2, p.111-124, 2006.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; HOAN, T.C.; SIEVERT, D.M.; POLLOK, D.A.; FRIDKIN, S.K. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.11, p.996-1011, 2008.

JANDA, J.M; ABBOUTT, S.L. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. **The Enterobacteria**. Washington, USA: ASM Press. 2nd ed., p.115-129, 2006.

KITCHEL, B.; RASHEED, J.K.; PATEL, J.B.; SRINIVASAN, A.; NAVON- VENEZIA, S.; CARMELI, Y.; BROLUND, A.; GISKE, C.G. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.8, p.3365–3370, 2009.

KONEMAN, E.W; ALLEN, S.D; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C; WINN J.R, WCW. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ed, Rio de Janeiro: editora Médica e Científica, p.1465, 2006.

KUMARASAMY, K.K; TOLEMAN, M.A; WALSH, T.R; BAGARIA, J; BUTT, F.

Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, n.9, p.597-602, 2010.

LASCOLS, C.; HACKEL, M.; HUJER, AM; MARSHALL, SH; BOUCHILLON, SK; HOBAN, DJ; BONOMO, RA. Using Nucleic Acid Microarrays To Perform Molecular Epidemiology and Detect Novel β -Lactamases: a Snapshot of Extended-Spectrum β -Lactamases throughout the World. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.5, p.1632-1639, 2012.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.557-84, 1995.

MACHADO A.; FERRAZ , A.A.B; FERRAZ, E.; ARRUDA, E.; NOBRE, J.; KONKEWICZ, L.R.; PIMENTEL, M.L; LEÃO, M.T.C; TRABASSO, P.; GRIMBAUM, R. Prevenção da Infecção Hospitalar - Projeto Diretrizes. **Sociedade Brasileira de Infectologia**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Prevenção da Infecção Hospitalar [página na internet], 2001. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/065.pdf.

MEDEIROS, A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, n.1, p.19-45, 1997.

MENEZES, E. A. Frequencia de *Serratia* spp. em Infecções Urinárias de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia em Fortaleza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.1, p.70-71, 2004.

MEYER G; PICOLI SU. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.47, n.1, p.25-31, 2011.

MILISAVLJEVIC, V.; WU, F.; LARSON, E.; RUBENSTEIN, D.; ROSS, B.; DRUSIN, L.M.; DELLA-LATTA, P.; SAIMAN, L. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* outbreaks in two neonatal intensive care units. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, n.9, p.719-721, 2004.

MONTEIRO, J., SANTOS, A.F., ASENSI, M.D., PEIRANO, G.,GALES, A.C., First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.

NETO, V.A.; NIDODEMO,A.C.;VASCONCELOS,H. Antibióticos na prática médica. 6° edição. **Editorial Sarver**, SP, Brasil, 2007.

NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. J.; COSTA, M. M. F. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem UERJ**, v.17, n.1, p.96-101, 2009.

NOGUEIRA, K.S; PAGANINI, M.C.; CONTE, A. ; COGO, L.L.;; TABORDA, M.R.I; DA SILVA, M.J; DALLA-COSTA, L. M . Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32, n.2, p.87-92, 2014.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T.The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Disease**, v.9, n.4, p.228-236, 2009.

NORDMANN, P; NAAS, T; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase - producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Disease**, v.124, n.9, p.1791–1798, 2011.

NORDMANN, P; GIRLICH,D; POIREL,L. Detection of carbapenemase producers in enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n.8, p.2761-6, 2012.

NOYAL, M.J.; MENEZES, G.A.; HARISH, B.N.; SUJATHA, S.; PARIJA, S.C. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of non fermentative Gram-negative bacteria. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, n.6, p.707-712, 2009.

O'HARA C, M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.1, p.147-162, 2005.

OLIVEIRA, R; MARUYAMA, S.A.T. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista eletrônica de Enfermagem**, v.10, n.3, p.775-783, 2008.

PADOVEZE, M.C; FORTALEZA, C.M.C.B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.48, n.6, p.995-1001, 2014.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M. ; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.6, p.2702-2702, 2009.

PATERSON, DL. Resistance in Gram-negative, bacteria *Enterobacteriaceae*. **American Journal Medical**, v.34, n.5, p.21-28, 2006.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.371-379, 2010.

PITOUT, J.D. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, n.9, p.578-579, 2010.

PLACON -Plano de contingência dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias nas infecções relacionadas á assistência à saúde do Estado do Rio de Janeiro. **PLACON ERC-RJ**: Rio de Janeiro/2014.

POURNARAS, S., POULOU, A.; TSAKRIS, A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.7, p.1319-1321, 2010.

POWERS, J.H. Antimicrobial drug development - the past, the present, and the future. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.4, p.23-31, 2004.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.3, p.440-458, 2007.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.

SENTRY antimicrobial surveillance program report: latina american and brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.1, p.25-79, 2004.

SAMRA, Z.; OFIR, O.; LISHTZINSKY, Y.; SHAPIRO, L.M.; BISHARA, J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, n.6, p.525–529, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - enfermagem**, v.13, n.esp, p.64-70, 2004.

SEIBERT, G.; HORNER, R.; HOLZSCHUH, M.; RIGHI, R.A.; FORNO, N.L.F.D.; SALLA, A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein (São Paulo)**, v.12, n.3, p.282-286, 2014.

SILVA, K.E.; CAYÔ, R.; CARVALHAES, C.G.; SACCHI, F.P.C.; COSTA, F.R.; SILVA, A.C.R.; CRODA, J; GALES, A.C.; SIMIONATTO, S. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, n.7, p.2324-2328, 2015.

SILVA, K.E.; MACIEL, W.G.; SACCHI, F.P.C.; CARVALHAES, C.G.; COSTA, F.R.; SILVA, A.C.R.; CRODA, M.G.; NEGRÃO, F.J.; CRODA, J.; GALES, A.C.; SIMIONATTO, S.. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Watch out for surgery. **Journal of Medical Microbiology**, [Epub ahead of print], 2016.

SOARES, VM. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.48, n.4, p.251-253, 2012.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica**, v.27, n.2, p.116-129, 2009.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase

issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.4, p.1019–1025, 2010.

TRABULSI, L. R. **Bactérias de interesse médico in: Microbiologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

WEBER, D.J; RAASCH, R; RUTALA, W.A. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens. **Chest Journal**, v.115, n.3, p.34-41, 1999.

WHO. The World Health Report 2000: health systems - improving performance. Geneva: **World Health Organization**, 2000.

WHO. Antimicrobial resistance: no action today, no cure tomorrow. **World Health Organization**, 2012.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.

5. ARTIGO

CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA E MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS-MS

Gleyce Hellen de Almeida de Souza¹; Simone Simionatto*¹

¹Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde - LPCS, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: simonesimionatto@ufgd.edu.br.

Resumo

Infecções causadas por enterobactérias produtoras de carbapenemases constituem um grave problema de saúde pública, devido ao seu alto potencial de disseminação e à resistência a múltiplas drogas, o que leva a limitação das opções terapêuticas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a caracterização molecular de isolados de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados-MS, durante junho de 2013 a novembro de 2014. A identificação das espécies bacterianas foi realizada através do sistema automatizado Vitek^{®2} (BioMérieux). O perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) foi avaliado pelo teste de microdiluição em caldo Mueller Hinton para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os isolados resistentes foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge (TMH) para triagem da produção de carbapenemases. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada visando identificar a presença de genes codificadores das carbapenemases (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{NDM-1}). Obteve-se 66 isolados de enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae* (n=56; 85%) e *Serratia marcescens* (n=10; 15%). Com a análise dos dados clínicos foi possível identificar que 59% das cepas foram isolados de *swab* retal, sendo que 54.5% dos pacientes estavam internados em Unidades de Terapia Intensiva Adulto. A maioria dos isolados era proveniente de pacientes do sexo masculino (64%) e com idade entre 66 a 85 anos (36%). Na determinação da CIM, 86.5% foram resistentes ao imipenem, 80.5% ao ertapenem e 79% ao meropenem. No TMH, 8 isolados de *S. marcescens* (80%) e 42 de *K. pneumoniae* (75%) foram classificadas como produtoras de

carbapenemases. A PCR demonstrou que o gene *bla*_{KPC-2} estava presente em todas os isolados de *S. marcescens* e em 35 isolados (62.5%) de *K. pneumoniae*. A presença dos demais genes pesquisados não foi evidenciada. Com estes resultados é possível identificar um elevado número de isolados de *S. marcescens* e *K. pneumoniae* produtoras da KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) neste hospital. Sendo assim, a elaboração de medidas de controle é de extrema importância para a redução da infecção hospitalar.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, resistência bacteriana, carbapenemases.

INTRODUÇÃO

As enterobactérias estão entre os patógenos humanos mais comuns, causando vários tipos de infecções, e conseqüentemente responsáveis por um número significativo de mortes, principalmente por acometerem indivíduos em ambiente hospitalar e adquirira capacidade de se disseminar facilmente (KUMARASAMY et al., 2010; NORDMANN et al., 2011).

A emergência de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos vem sendo reportada em vários países e tornou-se um grande desafio à saúde pública (BARROS et al., 2012). Por muito tempo essa classe de antimicrobianos foi considerada de última escolha na terapia contra infecções causadas por microrganismos Gram-negativos multirresistentes devido a sua estabilidade (QUEENAN & BUSH, 2007). Porém, o aumento significativo do uso terapêutico dos carbapenêmicos associado à exposição a outros medicamentos e a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, resultou em um crescente número de enterobactérias resistentes a esses compostos (YIGIT et al., 2001).

Vários mecanismos podem contribuir para a resistência a essa classe de antibióticos, como a impermeabilidade da membrana externa e hiper-expressão de bombas de efluxo, porém, a produção de carbapenemases é considerada o mecanismo de resistência mais importante, sendo estas enzimas capazes de hidrolizar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, tornando-os inativos (ALVES & BEHAR, 2013).

Dentre as β -lactamases, as carbapenemases são consideradas as enzimas de maior prevalência em enterobactérias, seguindo o sistema de classificação proposto por Ambler relacionado com a estrutura molecular das enzimas e a sequência de aminoácidos codificados, três classes moleculares foram descritas: carbapenemases da classe A (KPC), as metalo- β -lactamase (MBLs) da classe B (VIM, IMP, e NDM), e as oxacilinas da classe D (OXA-48) (DOYLE et al., 2012).

A *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) é a carbapenemase mais comum isolada de enterobactérias e confere resistência aos antibióticos de amplo espectro, como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. É habitualmente mais frequente em *Klebsiella pneumoniae* (ANDERSON et al., 2007), porém vem sendo relatada em diversas outras espécies de interesse clínico, como a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia marcescens* (MIRIAGOU et al., 2003; PETRELLA et al., 2008; SILVA et al., 2015).

Os genes codificadores das enzimas KPC geralmente estão inseridos em plasmídeos conjugativos, que podem apresentar diferentes tamanhos e agrupados a diversos grupos de incompatibilidade. Devido a esta característica cepas produtoras da KPC estão frequentemente relacionadas a surtos em diversos países. Estudos de epidemiologia molecular de enterobactérias contribuem para traçar medidas de controle de infecção hospitalar mais adequada à realidade das instituições de saúde (ERAÇ et al., 2014). Portanto, a identificação e determinação do perfil de resistência de bactérias multirresistentes contribui na escolha adequada da antibioticoterapia, bem como na implementação de medidas de controle que visem a redução das taxas de infecção hospitalar (DASH et al., 2013). O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana e a caracterização molecular de cepas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados-MS, buscando contribuir em medidas de controle de infecção hospitalar.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), com o número do parecer 130.754/2012 (Anexo 1).

Coleta e Isolamento das amostras bacterianas

Os isolados bacterianos foram coletados de amostras provenientes de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS, no período de junho de 2013 a novembro de 2014. Isolados que apresentaram perfil resistente ou intermediário a uma ou a várias cefalosporinas de terceira geração, foram incluídas no estudo. Dados de identificação bacteriana, coleta das amostras, ala de isolamento, amostra clínica, sexo e faixa etária dos pacientes foram coletados a partir dos registros do laboratório de análises clínicas do hospital.

Identificação fenotípica

A identificação dos isolados foi realizado através do sistema automatizado Vitek^{®2} (BioMérieux), segundo instruções do fabricante. A avaliação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo Mueller Hinton, seguindo as padronizações estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

As CIMs de antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), foram testadas em diferentes faixas de concentração, as quais variaram de 128 a 0,25 µg/mL. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo.

Os isolados foram inoculados em microplacas de 96 poços, e foram incubados à 36°C por um período de 24 h. Após este período, a CIM foi registrada como sendo a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo. A determinação da CIM, frente aos antibióticos carbapenêmicos seguiu as padronizações do CLSI (2015), conforme a tabela I.

Tabela I. Critérios utilizados para interpretação do CIM (µg/mL) como sensível, intermediário ou resistente, respectivamente, segundo preconização pelo CLSI (2015).

Agentes Antimicrobianos	Interpretação do CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ertapenem (ERT)	<0,5	1	>2
Imipenem (IMI)	<1	2	>4
Meropenem (MER)	<1	2	>4

Teste Modificado de Hodge (TMH)

Todos os isolados de enterobactérias que apresentaram resistência a carbapenêmicos foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge, utilizando o antibiótico ertapenem (sensibilidade e especificidade de 90%), de acordo com os critérios do CLSI (2014).

Utilizou-se como cepas padrão para o teste, a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1706 (controle negativo) e a *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1705 (controle positivo). As placas foram incubadas em temperatura de 35° C por um período de 16-24h. Os resultados foram avaliados a partir da análise das distorções da zona de inibição do carbapenem.

Extração de DNA genômico

Os isolados de *K. pneumoniae* foram cultivadas em ágar MacConkey e submetidas à extração de DNA por lise térmica, conforme Cuzon et al. (2010). Como *S. marcescens* são produtoras de DNases (MENEZES et al., 2004), para estes isolados a extração de DNA foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA minikit® (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. Após a extração do DNA os isolados bacterianos foram armazenados a -20°C para posterior avaliação genotípica.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença dos genes codificadores das carbapenemases (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{NDM-1}) foi avaliada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os *primers* específicos (FEHLBERG et al., 2014; POIREL et al., 2004). As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 50 µL, contendo 2 U de DNA Taq polimerase, 50 pmol de cada primer, 200 µM de cada DNTP, 1x tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂ e 10-50 ng de DNA. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (MyCiclerBioRAD) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45s, anelamento entre 55 °C - 65 °C (específico para cada *primer*) por 40s, extensão a 72°C por 40s e extensão final a 72°C por 7 minutos. As sequências dos *primers* e a temperatura de anelamento destes estão descritos na tabela II.

Tabela II. Gene, seqüências e temperatura de anelamento dos *primers*.

Gene	Primers	Seqüências (5' - 3')	T° anelamento
<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{KPC-2} F	TCTGGACCGCTGGGAGCTGG	55 °C
	<i>bla</i> _{KPC-2} R	TGCCCGTTGACGCCCAATCC	
<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{IMP-1} F	TCTACATGACCGCGTCTGTC	65 °C
	<i>bla</i> _{IMP-1} R	GAACAACCAGTTTTGCCTTACC	
<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1} F	ATTAGCCGCTGCATTGAT	58 °C
	<i>bla</i> _{NDM-1} R	CATGTCGAGATAGGAAGTG	
<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{VIM-1} F	TCTACATGACCGCGTCTGTC	60 °C
	<i>bla</i> _{VIM-1} R	TGTGCTTTGACAACGTTTCGC	
<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{OXA-48} F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	60 °C
	<i>bla</i> _{OXA-48} R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	

RESULTADOS

Amostras bacterianas

Durante o período de estudo obteve-se 66 isolados de enterobactérias com perfil resistente ou intermediário a cefalosporinas de terceira geração, sendo 56 isolados de *K. pneumoniae* (85%) e 10 *S. marcescens* (15%). Os isolados foram recuperadas de 61 pacientes, dos quais 64% eram do sexo masculino com idade entre 66 a 85 anos (36%).

A maioria dos isolados clínicos foram recuperados de swab retal (59%) e 54.5% dos isolados foram obtidas de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva Adulto (Tabela III).

Tabela III. Dados clínicos das amostras bacterianas de *S. marcescens* e *K. pneumoniae* isoladas neste estudo.

Dados Clínicos		Amostras bacterianas	
		<i>S. marcescens</i> n=10	<i>K. pneumoniae</i> n=56
Sexo	Feminino	5 (50%)	18 (32%)
	Masculino	5 (50%)	38 (68%)
Faixa etária	Neonatos (até 28 dias)	7 (70%)	6 (11%)
	Com até 3 meses	2 (20%)	-
	De 5 a 12 meses	-	5 (9%)
	25 – 35 anos	-	3 (5%)
	46 - 55 anos	-	4 (7%)
	56 – 65 anos	1 (10%)	10 (18%)
	66 – 75 anos	-	12 (21.5%)
	76 – 85 anos	-	12 (21.5%)
	Acima de 85 anos	-	4 (7%)
Amostra Clínica	Cateter	1 (10%)	1 (2%)
	Hemocultura	1 (10%)	3 (5%)
	Secreção Traqueal	1 (10%)	7 (12.5%)
	Swab Nasal	-	2 (3.5)
	Swab Retal	7 (70%)	32 (57%)
	Urocultura	-	10 (18%)
	Outras (Úlcera decúbito)	-	1 (2%)
Ala de Internação	Pediatria	-	1 (2%)
	Posto de atendimento	-	10 (18%)
	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal	2 (20%)	-
	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica	-	4 (7%)
	Unidade Intermediária (UI)	7 (70%)	6 (10.5%)
	Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Adulto	1 (10%)	35 (62.5%)

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana, 86.5% dos isolados foram resistentes ao imipenem, 80.5% ao ertapenem e 79% ao meropenem. Os demais resultados do teste de CIM podem ser observados na tabela IV e V.

Tabela IV. Resultado do Perfil de susceptibilidade das amostras bacterianas de *S. marcescens* e *K. pneumoniae* frente aos antibióticos ertapenem, meropenem e imipenem, segundo preconização pelo CLSI (2015).

Antibiótico	Perfil de susceptibilidade das amostras bacterianas					
	<i>S. marcescens</i> (n=10)			<i>K. pneumoniae</i> (n=56)		
	S	I	R	S	I	R
Ertapenem	-	4 (40%)	6 (60%)	9 (16%)	-	47 (84%)
Imipenem	-	1 (10%)	9 (90%)	4 (7%)	4 (7%)	48 (86%)
Meropenem	-	2 (20%)	8 (80%)	9 (16%)	3 (5.5%)	44 (78.5%)

Legenda: S=Perfil Sensível; I= Perfil Intermediário; R=Perfil Resistente

Tabela V. Sensibilidade bacteriana aos carbapenêmicos avaliados pelo teste de Concentração Inibitória Mínima.

Sensibilidade das amostras (µg/ml)	Variação da efetividade das amostras bacterianas					
	<i>S. marcescens</i> (n=10)			<i>K. pneumoniae</i> (n=56)		
	IMI	MERO	ERTA	IMI	MERO	ERTA
16	5	-	-	35	1	1
8	2	8	6	6	40	43
4	2	-	-	7	3	2
2	1	2	-	4	3	1
1	-	-	4	2	2	-
0,5	-	-	-	1	-	7
0,25	-	-	-	1	1	1
0,12	-	-	-	-	2	1
0,06	-	-	-	-	2	-
0,03	-	-	-	-	2	-
Total	10	10	10	56	56	56

Legenda: IMI=Imipenem; MERO= Meropenem; ERTA=Ertapenem.

Teste Modificado de Hodge (TMH)

A produção de carbapenemase foi detectada por TMH em 8 isolados de *S. marcescens* (80%) e 42 de *K. pneumoniae* (75%) sendo classificadas como possivelmente produtoras de carbapenemases. A Figura 2 demonstra o resultado positivo obtido pelo Teste Modificado de Hodge de isolados avaliados neste estudo.

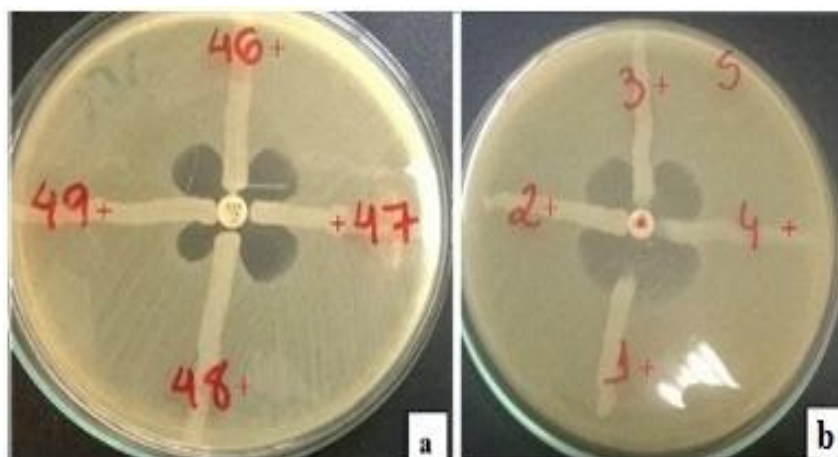


Figura 2. Teste Modificado de Hodge utilizando o antibiótico ertapenem (10 µg/ml).
Figura: a) *K. pneumoniae*; b) *S. marcescens*.

Reação em cadeia da Polimerase

A amplificação por PCR demonstrou que o gene *bla*_{KPC-2} estava presente em todos os isolados de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos e em 35 isolados (62.5%) de *K. pneumoniae* (Figura 3). A presença dos genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{NDM-1} não foi evidenciada nestes isolados.

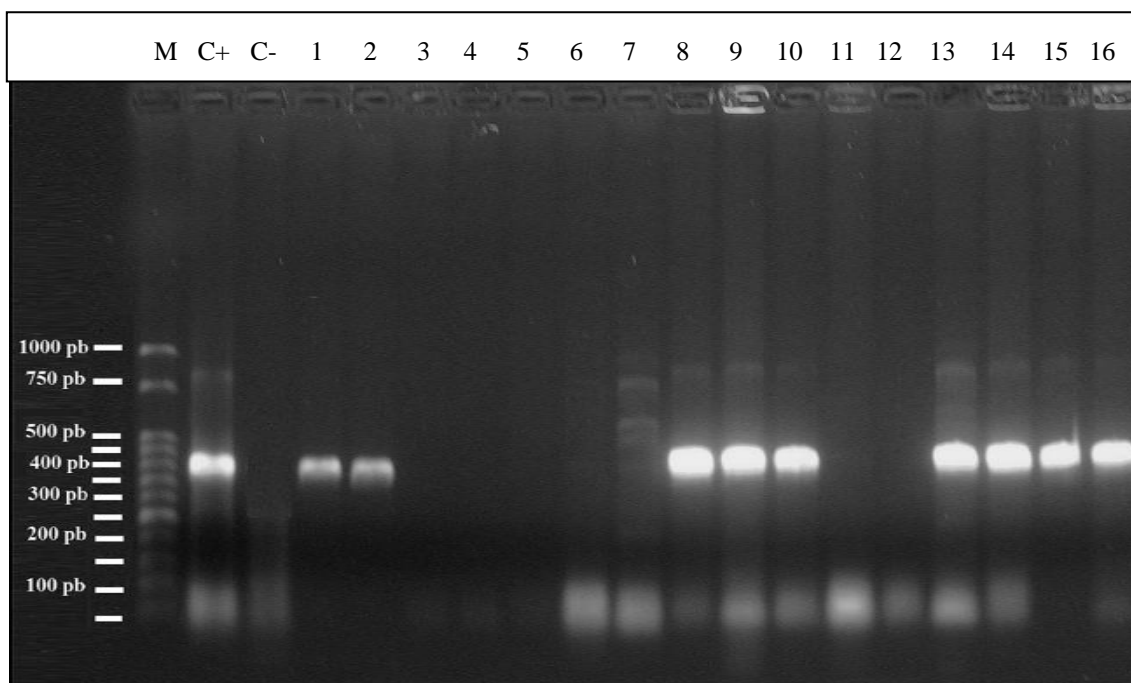


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) com resultado da amplificação por PCR do gene *bla*_{KPC-2} (399 pb) em *K. pneumoniae*. Coluna M, marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Sigma); coluna C+, controle positivo

da reação de PCR; Coluna C-, controle negativo da reação de PCR; Colunas 1, 2, 8, 9, 10, 13, 14, 15 e 16 isolados de *K. pneumoniae* com resultado positivo para a presença do gene bla_{KPC-2}; coluna 3, 4, 5, 6, 7, 11 e 12 resultado negativo na PCR.

DISCUSSÃO

A disseminação de enterobactérias produtoras de carbapenemases constitui um grave problema clínico e epidemiológico em várias instituições de saúde do Brasil que ameaça os cuidados de saúde (SCHWABER & CARMELI, 2007; LASCOLS et al., 2012, ANVISA, 2013). O perfil de resistência dos microrganismos varia de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes atendidos, doenças subjacentes e o uso de antimicrobianos (NOGUEIRA et al., 2014). Desta forma, é importante conhecer os padrões epidemiológicos e os determinantes genéticos que conferem essa resistência. Diante disso, este estudo realizou a caracterização molecular de cepas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados/MS.

Neste estudo a infecção causada por *S. marcescens* foi mais frequente em pacientes recém-nascidos (80%), enquanto que a infecção causada por *K. pneumoniae* foi maior em pacientes com idade entre 66 a 85 anos (43%). Estes resultados divergem de outros já descritos, onde as infecções foram mais frequentes em pacientes com faixa etária ≥ 60 anos (FALAGAS et al., 2007; TUON et al., 2012; CORREA et al., 2013; ALVEZ & BEHAR, 2013; JASKULSKI, 2013; SEIBERT et al., 2014; GAGLIOTTI et al., 2014; KOFTERIDIS et al., 2014; BIBERG et al., 2015; VARDAKAS et al., 2015). Embora os resultados do presente estudo não possam responder porque a prevalência de infecções por *S. marcescens* e *K. pneumoniae* foi maior em crianças e idosos, respectivamente, acredita-se a presença de outras enfermidades concomitantes, bem como a condição imunológica dos pacientes tenha influenciado estes resultados (TUON et al., 2012).

A maioria dos isolados foi recuperado de *swabs* de vigilância, indicando possivelmente que o quadro clínico dos pacientes era de colonização. Este resultado também foi observado no estudo de Almeida et al., (2012) no qual constataram que 42.5% dos isolados foram oriundos de *swab* retal.

A maioria dos pacientes colonizados com *K. pneumoniae* estavam

hospitalizados em UTIs, com várias co-morbidades e submetidos a intervenções médicas agressivas, incluindo exposição a antibióticos de amplo espectro. Esses resultados corroboram com estudos reportados anteriormente (MENEZES et al., 2007; MOURA et al., 2007; MAMMINA et al., 2010; JASKULSKI, 2013; BIBERG et al., 2015; PERNA et al., 2015; KATSIARIA et al., 2015).

Nos pacientes colonizados com *S. marcescens* a maior prevalência ocorreu na Unidade Intermediária (70%), a qual é destinada aos cuidados para com recém nascidos e crianças. Alguns estudos relatam a ocorrência de surtos de *S. marcescens* ocorrendo principalmente em pacientes pediátricos, em unidades de terapia intensiva neonatal e pediátrica (MANNING et al., 2001; JANG et al., 2001; ASSADIAN et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2008; MARAGAKIS et al., 2008; DESSI et al., 2009; VOELZ et al., 2010; ARSLAN et al., 2010; IOSIFIDIS et al., 2012).

Na determinação do perfil de susceptibilidade, a maioria dos estudos reportados na literatura descreve elevada resistência ao ertapenem, o qual tem maior sensibilidade para detectar a expressão dos isolados produtores da KPC (NORDMANN et al., 2012; JASKULSKI, 2013). No entanto, isolados de *S. marcescens* e *K. pneumoniae* reportados neste trabalho apresentaram maior resistência ao antibiótico imipinem, reforçando a ideia de que o perfil de resistência dos isolados bacterianos produtores de carbapenemase difere conforme a complexidade do hospital, características dos pacientes, doenças subjacentes e frequência no uso de antibióticos (CHANG et al., 2013).

Sessenta e seis isolados de *K. pneumoniae* e dez de *S. marcescens* foram submetidas ao Teste Modificado de Hodge, sendo que 42 (75%) e 8 (80%) foram positivas no testes, respectivamente, indicando serem possivelmente isolados produtores de carbapenemases. A amplificação por PCR demonstrou que o gene *bla*_{KPC-2} foi identificado em todas os isolados de *S. marcescens*, no entanto, somente 62.5% dos isolados de *K. pneumoniae* foram positivas no PCR. Este resultado divergente indica que outros mecanismos de resistência aos carbapenêmicos podem estar presentes nestes isolados bacterianos, como a alteração na permeabilidade da membrana, por perda ou modificações na estrutura dos canais de porina.

No entanto, é importante salientar que o TMH é um método fenotípico com 90% de sensibilidade e especificidade, indicando somente a existência de carbapenemases, não sendo específico para KPC (BARTH & RIBEIRO, 2012). Por outro lado, a PCR é o método padrão-ouro para detecção do gene *bla*_{KPC}, o qual codifica a produção da enzima

KPC (NORDMANN et al., 2009).

Em conclusão, o presente estudo evidenciou um elevado número de isolados de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos e produtoras da KPC circulantes neste hospital. Estes resultados indicam que a detecção precoce desses isolados pode contribuir para traçar ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por microrganismos multirresistentes de interesse clínico.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, 05/2011 e 04/2012) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 480949/2013-1).

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. **Nota Técnica n° 1/2013**, Brasília (DF), 2013.

Almeida LP, Carvalho FP, Marques AG, Pereira ADOSS, Bortoleto RP, Martino MD. Desempenho do disco de ertapenem como preditor da produção de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* por bacilos Gram-negativos isolados de culturas em um hospital municipal de São Paulo. **Einstein**. 2012;10 (4): 439-41.

Alves AP, Behar PRP. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**. 2013; 57 (3):213- 218.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol**. 2007; 45 (8): 2723-2725.

Arslan U, Erayman I, Kirdar S, Yuksekkaya S, Cimen O, Tuncer I, Bozdogan B. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. **Pediatr Int**.

2010; 52 (2): 208–212.

Assadian O, Berger A, Aspo CKC, Mustafa S, Kohlhauser C, Hirschl AM. Nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2002; 23 (8): 457-461.

Barros LM, Bento JNC, Caetano JÁ, Araujo TM, Moreira RAN, Pereira FGF, Frota NM, Soares E. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidades de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 2012; 33 (3): 429-435.

Barth AF, Ribeiro VB. Teste de Hodge modificado na detecção de KPC: um procedimento a ser aperfeiçoado ou esquecido? **Rev Epidemiol Control Infect.** 2012; 2 (1): 26.

Biberg CA, Rodrigues ACS, Carmo SF, Chaves CEV, Gales AC, Chang MR. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Braz J Microb.** 2015; 46 (2): 501-504.

Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari AC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla_{KPC}* gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2012; 46 (1): 114-115.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. **CLSI document M100-S24.** Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA. 2014; 34 (1): 51-60.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement. **CLSI document M100-S25.** Waine, PA, USA. 2015; 35 (3): 20-128.

Correa L, Martino MDV, Siqueira I, Pasternak J, Gales AC, Silva CV, Camargo TZS, Scherer PF, Marra AR. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infect Dis.** 2013; 13 (1): 80-88.

Cuzon, G; Naas, T; Truong, H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase bla_{KPC-2} gene. **Emerg Infect Dis**, 2010; 16 (9): 1349-1356.

Dash M, Padhi S, Pattnaik S, Mohanty I, Misra P. Frequency, risk factors, and antibiogram of *Acinetobacter* species isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital in Odisha, India. **Avicenna J Med**. 2013; 3 (4): 97-102.

Dessì A, Puddu M, Testa M, Marcialis MA, Pintus MC, Fanos V. *Serratia marcescens* infections and outbreaks in neonatal intensive care units. **J Chemother**. 2009; 21 (5): 493-499.

Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases. **J Clin Microbiol**. 2012; 50 (12): 3877-3880.

Eraç B, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu M, Oztürk I, Aydemir S. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Mikrobiyol Bul**. 2014; 48 (1): 70-81.

Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vartzili S, Chelvatzoglou FC, Papaioannou V, Maraki S, Samonis G, Michalopoulos A. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. **J Antimicrob Chemother**. 2007; 60 (5): 1124-1130.

Fehlberg LC, da Silva Nogueira K, Cayô da Silva R, Nicoletti AG, Palmeiro JK, Gales AC, Dalla-Costa LM. Detection of PER-2-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian liver transplantation unit. **Antimicrob Agents Chemother** 2014; 58 (3): 1831-1832.

Friedman ND, Kotsanas D, Brett J, Billah B, Korman TM. Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal unit via a case-control study and molecular typing. **Am J Infect Control** 2008; 36 (1): 22-8.

Gagliotti C, Giordani S, Ciccarese V, Barozzi A, Giovanazzi A, Pietrantonio AM, Moro ML, Pinelli G, Sarti M. Risk factors for colonization with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital: a matched case-control study. **Am J Infect Control**.

2014; 42 (9): 1006-1008.

Iosifidis E, Farmaki E, Nedelkopoulou N, Tsivitanidou M, Kaperoni M, Pentsoglou V, Pournaras S, Athanasiou-Metaxa M, Roilides E. Outbreak of bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric department. **Am J Infect Control.** 2012; 40 (1): 11-15.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca ME, Marinowic DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum Beta lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **Int J Agentes Antimicrob.** 2013; 42 (1): 76-79.

Jang TN, Fung CP, Yang TL, Shen SH, Huang CS, Lee SH. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. **J Hosp Infect.** 2001; 48 (1): 13-19.

Katsiaria M, Panagiotab G, Likousic S, Roussouc Z, Polemisd M, Vatapoulosb A, Platsoukac E, Maguinaa A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a Greek intensive care unit: Molecular characterisation and treatment challenges. **J Glob Antimicrob Resist.** 2015; 3 (2): 123–127.

Kofteridis DP, Valachis A, Dimopoulou D, Maraki S, Christidou A, Mantadakis E, Samonis G. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: a case-case-control study. **J Infect Chemother.** 2014; 20 (5): 293-297.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis.** 2010; 10 (9): 597-602.

Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, Bonomo RA. Using Nucleic Acid Microarrays To Perform Molecular Epidemiology and Detect Novel β -Lactamases: a Snapshot of Extended-Spectrum β -Lactamases throughout the World. **J Clin Microbiol.** 2012; 50 (5): 1632-1639.

Mammaia C, Palma DM, Bonura C. Outbreak of infection with *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 3 in an intensive care unit in Italy. **J Clin Microbiol.** 2010; 48 (4): 1506–1507.

Manning ML, Archibald LK, Bell LM, Banerjee SN, Jarvis WR. *Serratia marcescens* transmission in a pediatric intensive care unit: a multifactorial occurrence. **Am J Infect Control.** 2001; 29 (2): 115-119.

Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carroll KC, Perl TM. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2008; 29 (5): 418-423.

Menezes EA, Cezafar FC, Andrade MSS, Rocha MVAP, Cunha FA. Frequencia de *Serratia* spp. em Infecções Urinárias de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia em Fortaleza. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2004; 37 (1): 70-71.

Menezes EA, Sá MK, Cunha FA, Angelo RF, Oliveira IRN, Salviano MNC. Frequencia e percentual de susceptibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. **J Bras Patol Med Lab.** 2007; 43 (3): 149-155.

Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in *Salmonella* strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003; 47 (4): 1297–1300.

Moura MEB, Campelo SMA, Brito FCP, Batista OMA, Araujo TME, Oliveira ADSO. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Rev bras enferm.** 2007; 60 (4): 416-421.

Nogueira KDAS, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda MRII, Da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2014; 32 (2): 87-92.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**. 2009; 9 (4): 228-236.

Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemases producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **J Clin Microbiol**. 2012; 50 (8): 2761-2766.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase - producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**. 2011; 124 (9): 1791–1798.

Perna TDGS, Puiatti MA, Perna DH, Martins NMP, Pereira T, Couri MG, Ferreira CMD. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *Klebsiella* em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rev Soc Bras Clin Med**. 2015; 13 (2):119-123.

Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2008; 52 (10): 3725-3736.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiol**. 2007; 2 (5): 501-512.

Queenan AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**. 2007; 20 (3): 440-58.

Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**. 2007; 60 (5): 913-920.

Seibert G, Horner R, Holzschuh M, Righi RA, Forno NLFD, Salla A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

em um hospital escola. **Einstein**. 2014; 12 (3): 282-286.

Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Sacchi PCF, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **J Clin Microbiol**. 2015; 53 (7): 2324-2328.

Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, Pentead-Filho SR, Pilonetto M, Zavascki AP. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Braz J Infect Dis**. 2012; 16 (5): 416-419.

Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME, Antypa E, Koteli A, Antoniadou E. Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in the intensive care unit. **J Infect**. 2015; 70 (6): 592-599.

Voelz A, Müller A, Gillen J, Le C, Dresbach T, Engelhart S, Exner M, Bates CJ, Simon A. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. **Int J Hyg Environ Health**. 2010; 213 (2): 79-87.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001; 45 (4): 1151-1161.

6. ANEXOS

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS/UFMS											
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP												
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA												
Título da Pesquisa: Epidemiologia Molecular de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase Isoladas em um Hospital de Ensino de Dourados-MS.												
Pesquisador: Simone Simionatto												
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.												
Versão: 2												
CAAE: 05666812.3.0000.5160												
Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIV. FEDERAL DA GRANDE DOURADOS HOSPITAL												
DADOS DO PARECER												
Número do Parecer: 130.754												
Data da Relatoria: 09/10/2012												
Apresentação do Projeto:												
<p>O presente projeto propõe realizar um estudo de epidemiologia molecular de cepas de Enterobactérias produtoras de KPC isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário HU) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFMS). Os resultados obtidos com as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico e estudo de doenças infecciosas de origem hospitalar serão associados com a prevalência dos agentes envolvidos nestas enfermidades. Através da revisão de prontuários de pacientes internados no hospital será possível identificar os fatores de riscos associados à infecção ou colonização por micro-organismos multiresistentes de interesse clínico. Também serão realizadas investigações sobre a relação entre a gravidade dos pacientes e a aquisição dos isolados resistentes, a influência do tempo de exposição ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes infecciosos. Acredita-se que estes estudos possam contribuir para traçar medidas de contenção adequadas bem como para evitar futuros surtos de infecção dentro do ambiente hospitalar, contribuindo desta forma com ações de vigilância em saúde e consequentemente reduzindo os gastos do Sistema Único de Saúde com internações provenientes destes problemas.</p>												
Objetivo da Pesquisa:												
Estudar a ocorrência de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KPC) isoladas de pacientes												
<table border="0"> <tr> <td>Endereço: Rua João Rosa Góes, 761</td> <td>CEP: 79 825 070</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Vila Progresso</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: MS</td> <td>Município: DOURADOS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (67)3410-2328</td> <td>Fax: (67)341-3637</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: cep@ufgd.occ.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua João Rosa Góes, 761	CEP: 79 825 070	Bairro: Vila Progresso		UF: MS	Município: DOURADOS	Telefone: (67)3410-2328	Fax: (67)341-3637		E-mail: cep@ufgd.occ.br
Endereço: Rua João Rosa Góes, 761	CEP: 79 825 070											
Bairro: Vila Progresso												
UF: MS	Município: DOURADOS											
Telefone: (67)3410-2328	Fax: (67)341-3637											
	E-mail: cep@ufgd.occ.br											

Anexo 2: Instruções aos autores (Instructions to authors) - Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Instructions to authors

The Memórias' content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz has decided to simplify the requirements regarding the format of submitted manuscripts. From now on, all manuscripts may be submitted in any text format as long as the common subdivision of scientific articles are followed, e.g. introduction, materials and methods, results, discussion and references. For Reviews, Perspectives and similar articles, authors may use the sections that best suit the structure and content of the proposed manuscript. All manuscripts should contain, besides the title and abstract, full details of authors and institutions, acknowledgements of any technical or financial assistance as well as state any conflicts of interest. This flexible text format will be used for the initial analysis and peer review. If the manuscript is accepted, authors will be requested to edit the text in accordance with the publication style of the Memórias."

Upon acceptance, the manuscript should be arranged in the following format:

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures

followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations. In case of describing New Species, should follow:

- Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs xy): [Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 14)]
- Previous reference to the new species (when it is the case): [Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]
- Diagnosis (or Description; all stages are described);
- Type host (when it is the case);
- Site of Infection (when it is the case);
- Typelocality;
- Type data and depository;
- Other material examined (when it is the case);
- Distribution;
- Hostparasite
- data (such prevalence and other important data, when it is the same case);
- Bionomics;
- Etymology;
- Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

Figures and tables must be understandable without reference to the text

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman

numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 doublespaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Genome Announcement and Highlights: this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, resequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 3647, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- **Page charges:** there will be no page charges.
- **Proofs:** one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.