



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Graduação em Biotecnologia

Ruthe Aline da Silva Santos

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Acinetobacter baumannii*
EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS/MS

Dourados – MS
Maió/2016.

Ruthe Aline da Silva Santos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Acinetobacter baumannii*
EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS/MS**

Ruthe Aline da Silva Santos

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

Orientadora: Dr.^a Simone Simionatto

Co-Orientadora: Wirlaine Glauce Maciel

Dourados – MS

Maio/2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237c Santos, Ruthe Aline Da Silva

Caracterização Molecular de *Acinetobacter baumannii* em um Hospital Público de Dourados/MS: Caracterização Molecular de *Acinetobacter baumannii* em um Hospital Público de Dourados/MS / Ruthe Aline Da Silva Santos -- Dourados: UFGD, 2016.

48f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Simone Simionatto

Co-orientador: Wirlaine Glauce Maciel

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

Inclui bibliografia

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Infecção hospitalar. 3. Resistência bacteriana. 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.

Ruthe Aline da Silva Santos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Acinetobacter baumannii*
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
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Profª Drª Silvana Marchioro
Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências da Saúde

MSc. Kesia Esther Silva
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, __de Maiode 2016.

Dedico este trabalho...

À minha Co-orientadora Nani, à minha orientadora, meus colegas de laboratório, ao meu namorado e minha família. Dedico a eles e a todos que me apoiaram e incentivaram na construção e realização desse trabalho.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de concluir o ensino superior, à minha orientadora Dr^a Simone Simionatto por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ela, e ter me mostrado o caminho da pesquisa.

À mestranda Nani pela grande dedicação, paciência e carinho dado tanto a mim quanto a pesquisa.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa GPBMM envolvidos nessa linha de pesquisa que estiveram presentes na realização dos experimentos, agradeço ao Romário, Mariana, Gleyce Hellen, Nathalie e aos demais colegas de laboratório por ajudar de alguma forma, Júlio Henrique, Maria Lourenza, Katheleen, Pamela, Ronaldo, Kesia, Maisa e Lais.

Agradeço também os meus amigos, Gleyce Hellen, Thaianne, Robson, Thamiris e Wellinson pelo incentivo, conforto e carinho nos momentos felizes e difíceis, a minha família e meu namorado pelo incentivo, amor e por acreditar em mim.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelo espaço cedido, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

“O homem terrestre não é um deserdado. É filho de Deus, em trabalho construtivo, envergando a roupagem da carne; aluno de escola benemérita, onde precisa aprender a elevar-se. A luta humana é a sua oportunidade, a sua ferramenta, o seu livro. ”

Emmanuel

Pedro Leopoldo (MG), 3 de Outubro de 1943.

(Nosso Lar - Chico Xavier - Pelo espírito André Luiz)

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Infecção Hospitalar.....	2
2.2 <i>Acinetobacter</i> spp.....	3
2.3 Mecanismos de resistência de <i>Acinetobacter baumannii</i> aos carbapenêmicos.....	5
2.4 Epidemiologia molecular de <i>Acinetobacter baumannii</i>	6
3. Referencias Bibliograficas.....	8
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo geral.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5 ARTIGO.....	16
6 CONCLUSÃO.....	37
7. ANEXO.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphic* (Amplificação de pequenos fragmentos polimórficos)

bla-gene que codifica para a β -lactamase

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de padronização de laboratório clínico)

CIAB-*Acinetobacter baumannii* intermediário a carbapenêmicos

CRAB-*Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos

CSAB-*Acinetobacter baumannii* susceptível carbapenêmicos

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ESBL - β -lactamases de espectro estendido

HU -Hospital universitário

MALDI TOF MS - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight* (ionização por dessorção a laser assistida por matriz em um analisador do tipo tempo de voo)

M β L -Metallo- β -lactamase

MDR -multidrogas resistentes

MDR-AB-*Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes

MLST- *Multilocus Sequence Typing* (Digitação de sequencia multilocus)

OXA - β -lactamase do tipo oxacilinase

PCR -Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).

PFGE-*Pulsed-field Gel Electrophoresis* (técnica de eletroforese em gel de campo pulsado)

RAPD- *Random Amplified Polymorphic*(Amplificação randômica de fragmentos polimórficos)

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes codificadores de carbapenemases.....	16
TABELA II. Características clínicas de 65 pacientes onde foram isoladas as cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos (CRAB)	18
TABELA III. Avaliação do perfil de susceptibilidade a carbapenêmicos das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> coletadas entre Janeiro à Dezembro de 2014.....	19
Figura 2. Número de amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> distribuídas por grupos etários de pacientes internados no HU.....	20
Figura 3. Número de cepas de <i>A. baumannii</i> isoladas de diferentes unidades hospitalares.....	20
Figura 4. Distribuição de cepas de <i>A. baumannii</i> isoladas de amostras clínicas.....	21
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed® (Uniscience) do gene <i>bla_{OXA-23}</i> amplificado por PCR.....	27
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed® (Uniscience) do gene <i>bla_{OXA-51}</i> amplificado por PCR.....	28

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares constituem um problema de saúde pública emergente, uma vez que o aumento de casos relacionados às infecções nosocomiais compõem elevados índices de morbidade e mortalidade, além de estabelecerem períodos de internação prolongados e altos custos para o sistema de saúde (Rosangela De and Sônia Ayako Tao, 2008). Os índices de infecção hospitalar tendem a ser maiores em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) quando comparados aos demais setores hospitalares. Diversos fatores contribuem para esta ocorrência, dentre eles a condição dos próprios pacientes, comprometimento do sistema imunológico, doenças de base, procedimentos invasivos, longos períodos de internação, uso prévio de antibióticos, entre outros (Eggimann and Pittet, 2001).

Acinetobacter baumannii é responsável por diferentes tipos de infecções, como pneumonias, meningites, infecções urinárias, feridas operatórias, do trato respiratório, dentre outras. Além disso, o tratamento das infecções ocasionadas por esta bactéria tem se tornado um fator preocupante, em função do surgimento de cepas multirresistentes, o que torna as opções terapêuticas restritas. (Abdalhamid et al., 2014).

Dentre os mecanismos de resistência, destacam-se a reduzida permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alteração nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de beta-lactamases (Giamarellou et al., 2008; Peleg et al., 2008). No entanto, o mecanismo que mais contribui para a rápida disseminação de cepas multirresistentes dentro de ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência e produção de enzimas beta-lactamases, as quais se propagam principalmente por plasmídeos, *transposons* ou *integrans* (Valenzuela et al., 2007), e do elemento de inserção *ISAbal* localizado *upstream* a genes de resistência como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{AmpC} tem sido associado a um aumento na resistência aos carbapenêmicos. Além disso, *ISAbal* possui a capacidade de mobilizar genes como *bla*_{OXA-23} tornando a disseminação desses genes cada vez mais facilitada por esses elementos genéticos moveis (Martins et al., 2012).

No estado do Mato Grosso do Sul não existem relatos sobre o monitoramento de cepas de *A. baumannii* multirresistentes a carbapenêmicos. Tendo em vista a crescente importância do levantamento e ocorrência de cepas multidrogas resistentes (MDR) para a clínica médica, juntamente com a falta de dados no estado do Mato Grosso do Sul, justifica-se a realização deste trabalho visando caracterizar cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos a fim de identificar o perfil de susceptibilidade e avaliar a prevalência destas cepas em um Hospital Público de Dourados/MS.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1 Infecção hospitalar

O controle de casos de infecção, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) são de difícil conduta (Aloush et al., 2006) devido as condições dos próprios pacientes, como longos períodos de internação, realização de procedimentos invasivos, doenças de base, utilização constante de antibióticos de largo espectro, dentre outros (de Sousa et al., 2008); (Oliveira et al., 2010).

Embora a condição do paciente seja importante para o desenvolvimento de infecções, a utilização prévia de antibióticos na clínica médica também contribui para que as infecções hospitalares tornem-se um importante veículo de disseminação de bactérias multirresistentes dentro das instituições de saúde (Bush, 2010; Rosângela De and Sônia Ayako Tao, 2008), passando a ser uma preocupação não somente dos órgãos competentes, mas também a nível social (Figueiredo et al., 2011).

Deve-se também considerar um fator determinante para o surgimento das infecções as características dos hospitais que apresentam uma grande rotatividade de seus leitos. A ocupação dos leitos imediatamente após serem vagos, favorece a inadequada limpeza e higienização, contribuindo para a proliferação de bactérias multirresistentes entre os pacientes (Neto, et al., 2010). As bactérias Gram-negativas são os patógenos com maior relevância clínica e epidemiológica nos ambientes hospitalares, dentre elas as pertencentes à família *Moraxellaceae* (Peleg et al, 2008).

2.2 *Acinetobacter* spp.

O gênero *Moraxella*, que foi proposto pela primeira vez por Lwoff em 1939, foi colocada na família *Neisseriaceae* em 1968 pela Henriksen e BØvre com base em similaridades fenotípicas e dados de transformação genética (Rossau et al., 1991). Em 1971, o gênero *Acinetobacter* também foi incluído no *Neisseriaceae* (Lessel, 1971). Por vários anos, a composição do *Neisseriaceae* se manteve inalterada (Rossau et al., 1991).

O gênero *Acinetobacter* remonta ao início do século 20, em 1911, quando Beijerinck, um microbiologista holandês, descreveu um organismo chamado *Micrococcus calco-Aceticus* que foi isolado a partir do solo por enriquecimento em um meio mínimo de cálcio contendo-acetato (Beijerinck, 1911).

A designação do gênero atual *Acinetobacter*, foi inicialmente proposto por Brisou e Prévot em 1954 para separar a motilidade dos microrganismos, motilidade dentro do gênero *Achromobacter* (Brisou et al., 1954). Foi somente até em 1968 que esta designação de gênero tornou-se mais amplamente aceita (Baumann et al., 1968). Em 1968 uma pesquisa concluiu que as diferentes espécies possuíam essa característica semelhante foram listadas pertencentes a um único gênero, para o qual o nome *Acinetobacter* foi proposto, e que mais subclassificação em espécies diferentes com base em características fenotípicas não era possível (Baumann et al., 1968). Estes achados resultaram no reconhecimento oficial do gênero *Acinetobacter* pelo Subcomitê sobre a Taxonomia de *Moraxella* e aliadas Bactérias em 1971 (Lessel, 1971).

O gênero *Acinetobacter* spp. pertence à família *Moraxellaceae* (Peleg et al., 2008), compreende 31 espécies diferentes, (Peleg et al., 2008; Enoch et al., 2008; Molina et al., 2010) e engloba bactérias coco bacilares, gram-negativas, não fermentadoras de glicose, estritamente aeróbias, imóveis, não produtoras de pigmentos, catalase-positivas e oxidase-negativas (Von Graevenitz, 1995). Das 31 espécies de *Acinetobacter* spp., a considerada mais frequente em ambientes hospitalares é o *Acinetobacter baumannii*, no entanto outras espécies estão relacionadas a casos infecciosos, como *A. pittii*, *A. nosocomialis*, (Nemec et al., 2011; Peleg et al., 2008), *A. calcoaceticus* (Camargo et al., 2013; Hsieh et al., 2014), *A. lwoffii* (Kim et al., 2014; Kamolvit et al., 2014), *A. johnsonii* (Kamolvit et al., 2014; Zong et al., 2013), *A. haemolyticus* (Funahashi et al., 2013), *A. junii* (Zhou et al., 2013).

O gênero *Acinetobacter* é amplamente distribuído na natureza e geralmente ocorre no solo (Nageeb et al., 2015). *Acinetobacter baumannii* sobrevive em superfícies úmidas ou secas, além de apresentar rápida colonização na pele de pacientes e da equipe de saúde, facilitando a sua transmissão e prolongando os surtos hospitalares (Al-Shaer et al., 2014).

Acinetobacter sp é relativamente não virulento e, até que se saiba melhor, não possui toxinas específicas ou habilidade em sobreviver intracelularmente. Colonização da pele e mucosas é mais comum do que infecção, e a invasão de tecidos é limitada, quando as defesas do hospedeiro estão intactas. Pacientes hospitalizados, debilitados, submetidos a procedimentos invasivos e terapêutica antimicrobiana de amplo espectro, especialmente os internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), são os hospedeiros ideais para infecções pela espécie *A. baumannii* (Villar et al., 2014).

Durante as últimas décadas *A. baumannii* tem sido cada vez mais reconhecido como um patógeno significativo de infecções hospitalares, e tem emergido como um patógeno nosocomial importante, especialmente em UTI (Nageeb et al., 2015), onde vários surtos tem sido relatados com frequência (Zhou et al., 2011). Este patógeno se tornou um alvo de vigilância por ter rápida emergência de resistência, aumento da incidência e a propagação mundial de isolados multirresistentes (Liu et al., 2014).

2.3 Mecanismos de resistência de *Acinetobacter baumannii* aos carbapenêmicos

O surgimento da multirresistência bacteriana se tornou um fator alarmante, já que muitas espécies bacterianas consideradas clinicamente importantes passaram a adquirir resistência a vários antibióticos, diminuindo as opções terapêuticas para o tratamento de infecções hospitalares (Lesho et al., 2013). A resistência aos antibióticos se desenvolveu como uma consequência natural da habilidade das cepas bacterianas se adaptarem à pressão seletiva exercida pelo uso constante e indiscriminado de antibióticos (Seifert et al., 2005). Devido ao surgimento da resistência a diversas classes antimicrobianas, os carbapenêmicos passaram a ser a principal escolha para o tratamento de infecções ocasionadas por *A. baumannii*, bem como de outras espécies do gênero (Enoch et al., 2008). No entanto, com o aumento da frequência no uso de carbapenêmicos, principalmente meropenem e imipenem, cepas de *A. baumannii* passaram a adquirir resistência a esta classe, e conseqüentemente passaram a ser relatadas em diferentes partes do mundo (Kuo et al., 2012; Mohanty et al., 2013; Neonakis et al., 2011), tornando as opções terapêuticas restritas (Safari et al., 2013).

A multirresistência à carbapenêmicos pode muitas vezes ser explicada por alguns mecanismos, tais como reduzida permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alteração nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e inativação estrutural do antibiótico pela produção de enzimas (Peleg et al., 2008; Giamarellou et al., 2008).

As enzimas β -lactamases, mecanismo mais importante de resistência adquirida em gram-negativos (Jeon et al., 2005), são divididas em classes de acordo com a similaridade entre as sequências dos aminoácidos e identificadas como classes A, B, C e D. Na classe A, são incluídas as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbapenemases do tipo serina, como as KPCs. Na classe B, as metalo-beta-lactamases, como *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, na classe C, encontra-se as cefalosporinas (AmpC) e na classe D, as oxacilinas como, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-58} (Ambler et al., 1991).

A perda de permeabilidade da membrana externa, devido a alterações específicas nas porinas é um mecanismo de resistência intrínseca a carbapenêmicos em *A. baumannii* (Novovic et al., 2015). Na célula bacteriana, para que os antimicrobianos consigam atravessar a bicamada lipídica presente na membrana externa das bactérias, é necessário que haja canais transportadores disponíveis, denominados porinas de membrana (OMP), os quais são canais aquosos compostos por proteínas. No entanto, podem ocorrer modificações na permeabilidade da membrana e alterações na estrutura das proteínas, fazendo com que estas estruturas se tornem impermeáveis a compostos hidrofóbicos, e, portanto, o antibiótico não consiga reconhecer a estrutura bacteriana, não conseguindo agir sobre a mesma (da Silva et al., 2007).

A resistência pela modificação nos sítios de ligação dos antibióticos ocorre por mutações nos genes cromossômicos, que codificam enzimas com menor afinidade para o antibiótico, sendo assim o antibiótico não reconhece o alvo presente na célula bacteriana, não ocorrendo a morte celular (da Silva et al., 2007).

As bombas de efluxo são estruturas responsáveis pelo transporte de compostos orgânicos tóxicos, para fora da célula bacteriana. Devida a baixa permeabilidade da membrana externa, quando os sistemas ativos de efluxo estão presentes, o antibiótico tem dificuldade para penetrar através da membrana externa, então o antibiótico é expulso para fora do citoplasma da célula, não conseguindo realizar a morte celular bacteriana (da Silva et al., 2007).

A identificação dos mecanismos de resistência as principais classes de antibióticos auxiliam na compreensão das infecções ocasionadas por *A. baumannii* e outras espécies do gênero na clínica médica (Al-Sweih et al., 2012; Khan et al., 2012). Além disso, compreender quais mecanismos estão envolvidos na resistência antimicrobiana contribui para o tratamento clínico das infecções hospitalares (Martins et al., 2013; Giamarellou et al., 2008).

2.4 Epidemiologia molecular de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos

A investigação epidemiológica molecular de bactérias é um dos pilares que desencadeiam medidas de controle de infecção específicas, que são necessários para eliminar *A. baumannii* e evitar a sua propagação (Tomaschek et al., 2016). A epidemiologia das infecções ocasionadas por *A. baumannii* é considerada por muitas vezes complexa, não somente pelos mecanismos de resistência, mas também pela coexistência de infecções endêmicas em uma determinada unidade hospitalar, o que torna constante o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro por períodos prolongados, favorecendo a pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar e a seleção de cepas multirresistentes (Martins et al., 2013).

Resultados obtidos pela técnica de *Amplified Fragment Length Polymorphic* (AFLP) demonstraram diferenças genéticas de três grupos clonais de *A. baumannii* e mostrou que existia uma diferença genética elevada entre os grupos, confirmando a existência de três grupos clonais bem distintos presentes nas enfermarias monitoradas em Florença, na Itália (Donnarumma et al., 2010).

Na Espanha, um estudo avaliou o perfil clonal de 729 cepas de *A. baumannii* por MLST e identificou um coeficiente de semelhança genética de 50% a 100%. No entanto consideraram clones apenas as cepas que apresentaram uma similaridade genética a partir de 80% (Villalo et al., 2011).

A análise do perfil clonal com cepas de *A. baumannii* isoladas de unidades hospitalares na África do sul indicou através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing*(MLST) que as cepas eram clones contendo o gene OXA-23 (Lowing et al., 2015). Um estudo de tipagem por PFGE e MLST em isolados clínicos de *A. baumannii* realizado em Los Angeles identificaram que os isolados clínicos pertenciam a dois clones principais pertencentes a dois Tipos de Sequência (ST), ST1 e ST2, sendo que 76,2% dos isolados testados pertenciam a ST2 (El-Shazly et al., 2015).

Um estudo realizado na Índia utilizando a técnica *Randon Amplified Polymorphic* (RAPD) e MSLT identificou um alto grau de variabilidade genética entre os 100 isolados clínicos, com 53 padrões de RAPD distintos, dos quais 18 mostraram 100% de similaridade. Constataram que a técnica MLST deve ser realizada para a vigilância epidemiológica, a fim de aprender sobre a variabilidade e prevalência de clones de multirresistentes no mundo (Rynga et al., 2015).

Em Meca na Arábia Saudita, 107 isolados de UTI de diferentes hospitais obtiveram identificaram oito ST, sendo que os predominantes foram ST195 e ST557 e todos eles pertencem ao complexo clonal em todo o mundo (CC) 2 (Alyamani et al., 2015). No Kuwait, 33 isolados *A. baumannii* foram analisados por MLST e 20 ST foram diferentes, dos quais seis eram novas, sendo que o mais frequente foi a ST2 e o complexo clonal predominante foi CC2. Na análise do perfil clonal apenas três dos isolados padrões de PFGE foram idênticos, o que indica a possibilidade de um falso surto (Vali et al., 2015).

O primeiro relato da ocorrência dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-58} em *A. baumannii* nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, respectivamente, através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram analisados 20 isolados de *A. baumannii*, e somente aqueles que transportavam os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-58} eram resistentes a carbapenêmicos (Figueiredo et al., 2011).

Um estudo realizado em Curitiba, Brasil analisou cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos obtidas a partir de oito pacientes em dois hospitais. Os isolados eram multirresistentes, pertenciam a uma única estirpe, e produziam a carbapenemase OXA-23. Constataram que as opções de tratamento eram limitadas, embora os isolados foram sensíveis à polimixina B in vitro. E com base nos padrões idênticos de PFGE e resultados de testes de sensibilidade aos antibióticos, relataram que uma única cepa *A. baumannii* produtora de OXA-23 se espalhou entre os dois hospitais, sendo que essa cepa contribuiu para a mortalidade dos pacientes mesmo quando polimixina B, um medicamento com uma atividade in vitro, foi administrado (Dalla-Costa et al., 2003).

No Brasil a emergência e propagação de OXA-23 aparentemente começou em Curitiba, Estado do Paraná, em 2003. A partir de 2003, esta enzima tem sido encontrado em outros estados, como São Paulo (Antonio et al 2008; Antonio et al., 2009; Mostachio et al., 2012), Rio de Janeiro (Carvalho et al., 2009; Carvalho et al., 2011), Rio Grande do Sul (Martins et al., 2009; Martins et al., 2013), Espírito Santo, Alagoas, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas

Gerais, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul (Carvalho et al., 2011) e Mato Grosso (investigação em andamento)

3. REFERENCIAS

- Abdalhamid, B., H. Hassan, A. Itbaileh, and M. Shorman. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia: *New Microbiol*, v. 37, p. 65-73; 2014
- Alyamani, E. J., Khiyami, M. A., Booq, R. Y., Alnafjan, B. M., Altammami, M. A., & Bahwerth, F. S. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 1; 2015.
- Aloush, V., S. Navon-Venezia, Y. Seigman-Igra, S. Cabili, and Y. Carmeli. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 43-8; 2006.
- Al-Shaer M, Nazer LH, Kherallah M. Rifampicin as Adjunct to Colistin Therapy in the Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Pharmacother*. 2014.
- Al-Sweih NA, Al-Hubail M, Rotimi VO. Three distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with high diversity of carbapenemases isolated from patients in two hospitals in Kuwait. *J Infect Public Health*;5(1):102-8; 2012.
- Ambler, RP; Coulson, AFW; Frere JM, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal*, p. 269-270, 1991.
- Antonio, CS et al. . Surto de *Acinetobacter baumannii* multirresistente: Caracterização de bla-OXA-23 como genes .1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica (SIMC), Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.
- Antonio, CS et al. Disseminação e Emergência de genes blaOXA-23, blaOXA-58, blaOXA-72 e Sequências de Inserção (IS) em Isolados de *Acinetobacter baumannii* Resistentes AOS carbapenêmicos . In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM), Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, 2009, n. 1508-1.

- Beijerinck, M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam 19:1092-1103, 1911.
- Brisou, J., and A. R. Prevot. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 86:722-728, 1954.
- Bush, K. Alarming β - lactamase- mediated resistance in multidrug- resistant *Enterobacteriaceae*: *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, p. 558-564; 2010.
- Camargo CH, Bruder N. A. Defining resistance in *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex strains. *Antimicrob Agents Chemother*;57(5):2442; 2013.
- Carvalho, KR et al. Disseminação de multirresistentes *Acinetobacter baumannii* genótipos portadores bla (OXA-23) da rede de hospitais do Rio de Janeiro, Brasil. *Int J Agentes Antimicrob* , v. 34, n. 1, p. 25-8, 2009.
- Carvalho, KR et al. Disseminação de genótipos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* Produtores de carbapenemase OXA-23 em Diferentes Estados do Brasil. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2011, n. 962-1
- de Sousa, C. M. M. D., Alves, M. D. S. D. C., Moura, M. E. B., & Silva, A. O. The rights of health users in cases of hospital infection. *Revista brasileira de enfermagem*, 61(4), 411-417; 2008.
- Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. A., Castro, M. E., Stier, C. J., Bragagnolo, K. L., ... & Woodford, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 2003, 3403-3406.
- Donnarumma F, Sergi S, Indorato C, Mastromei G, Monnanni R, Nicoletti P, et al. Molecular characterization of *Acinetobacter* isolates collected in intensive care units of six hospitals in Florence, Italy, during a 3-year surveillance program: a population structure analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1297-304.
- Eggimann, P., and D. Pittet. Infection control in the ICU: *Chest*, v. 120, p. 2059; 2001.
- Enoch, D. A., C. Summers, N. M. Brown, L. Moore, M. I. Gillham, R. M. Burnstein, R. Thaxter, L. M. Enoch, B. Matta, and O. Sule. Investigation and management of an outbreak of multidrug- carbapenem- resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK: *Journal of Hospital Infection*, v. 70, p. 109-118; 2008.

- El-Shazly, S., Dashti, A., Vali, L., Bolaris, M., & Ibrahim, A. S. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 42-49; 2015.
- Figueiredo, D. Q., K. R. Santos, E. M. Pereira, R. P. Schuenck, C. R. Mendonça-Souza, L. M. Teixeira, and S. S. Mondino. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 368-70.
- Funahashi T, Tanabe T, Maki J, Miyamoto K, Tsujibo H, Yamamoto S. Identification and characterization of a cluster of genes involved in biosynthesis and transport of acinetoferrin, a siderophore produced by *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906T. *Microbiology*. 2013;159(Pt 4):678-90.
- Giamarellou, H., A. Antoniadou, and K. Kanellakopoulou. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?: *Int J Antimicrob Agents*, v. 32, p. 106-19; 2008.
- Hsieh WS, Wang NY, Feng JA, Weng LC, Wu HH. Types and prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in Northern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* ;58(1):201-4; 2014.
- Jeon B. C., Jeong S. H., Bae I. K., Kwon S. B., Lee K., Young D., et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n, 5, p. 2241-5; 2005.
- Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, Seifert H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*;69(4):959-63; 2014.
- Khan FY, Abukhattab M, Baager K. Nosocomial postneurosurgical *Acinetobacter baumannii* meningitis: a retrospective study of six cases admitted to Hamad General Hospital, Qatar. *J Hosp Infect*; 80(2):176-9; 2012.
- Kim MG, Jeon JW, Ryu IH, Lee JJ, Kim JS, Choi JW, et al. Mycotic abdominal aortic aneurysm caused by bacteroides thetaiotaomicron and *Acinetobacter lwoffii*: the first case in Korea. *Infect Chemother*; 46(1):54-8; 2014.
- Kuo, S. C., S. C. Chang, H. Wang, J. Lai, P. C. Chen, Y. Shiau, I. Huang, and T. Lauderdale. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10

- years: Nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program: *Bmc Infectious Diseases*, v. 12; 2012.
- Lesell, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Minutes. Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 21:213-214; 1971.
- Lesho, E., E. J. Yoon, P. McGann, E. Snesrud, Y. Kwak, M. Milillo, F. Onmus-Leone, L. Preston, K. St Clair, M. Nikolich, H. Viscount, G. Wortmann, M. Zapor, C. Grillot-Courvalin, P. Courvalin, R. Clifford, and P. E. Waterman. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections: *J Infect Dis*, v. 208, p. 1142-51; 2013.
- Liu, B., Y. Liu, X. Di, X. Zhang, R. Wang, Y. Bai, and J. Wang. Colistin and anti-Gram-positive bacterial agents against *Acinetobacter baumannii*: *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 47, p. 451-6; 2014.
- Lowings, M., Ehlers, M. M., Dreyer, A. W., & Kock, M. M. "High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa—an update." *BMC infectious diseases*. 15.1:1. 2015.
- Martins AF, Barth AL. *Acinetobacter* spp. multirresistente – um desafio para a saúde pública. *Scientia Medica*:56-62; 2013.
- Martins, A. F., Kuchenbecker, R. S., Pilger, K. O., Pagano, M., & Barth, A. L.. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *American journal of infection control*, 40(2), 2012, 108-112.
- Martins, AF . Et al resistentes aos carbapenem *Acinetobacter baumannii* produzir o OXA-23 enzima: divulgação no sul do Brasil. *A infecção* , v 37, n.. 5, p. 474-6, 2009.
- Molina J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Ribera A, Beceiro A, et al. Clinical Features Of Infections And Colonization By *Acinetobacter* Genospecies 3. *J Clin Microbiol*; 48(12):4623-6; 2010.
- Mohanty, S., V. Maurya, R. Gaiind, and M. Deb. Phenotypic characterization and colistin susceptibilities of carbapenem-resistant of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp: *Journal of infection in developing countries*, v. 7, p. 880; 2013.

- Mostachio, AK et al. A alta prevalência de OXA-143 e alteração de proteínas da membrana externa em carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp . isola no Brasil. *Int J Agentes Antimicrob* , v. 39, n. 5, p. 396-401, 2012.
- Nageeb W, et al. In vitro antimicrobial synergy studies of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units of a tertiary care hospital in Egypt. *J Infect Public Health*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.05.007>; 2015.
- Neonakis, I. K., D. A. Spandidos, and E. Petinaki. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review: *Int J Antimicrob Agents*, v. 37, p. 102-9; 2011.
- Neto, G. T. C. et al. Detecção de Enterobactérias em superfícies de uma unidade mista de saúde no município de São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma*;1(2):77-84.
- Oliveira, A., C. S. Cardoso, and D. Mascarenhas. Contact Precautions In Intensive Care Units: Facilitating And Inhibiting Factors For Professionals' Adherence: *Revista Da Escola De Enfermagem Da Usp*, v. 44, p. 161-165; 2010.
- Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen: *Clin Microbiol Rev*, v. 21, p. 538-82; 2008.
- Rynga, D., Shariff, M., & Deb, M. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Delhi, India. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 1; 2015.
- Rosangela De, O., and M. Sônia Ayako Tao. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado: *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 10, p. 775; 2008.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., & De Ley, J."Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41.2: 310-319; 1991.
- Safari, M., M. Y. Alikhani, M. Saidijam, A. Bahador, and R. Jafari. High prevalence of multidrug resistance and metallo- beta- lactamase (m β l) producing *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in icu wards, Hamadan, Iran: *Journal of Research in Health Sciences*, v. 13, p. 162-167; 2013.

- Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., ... & Dijkshoorn, L. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4328-4335; 2005.
- Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparação de Sequence Typing Dois Multi-Locus (MLST) Regimes para Caracterização de *Acinetobacter baumannii* Outbreak e isola esporádicos. *PLoS ONE* 11 (4): e0153014. doi: 10.1371 / journal.pone.0153014; 2016.
- Vali, L., Dashti, K., Opazo-Capurro, A. F., Dashti, A. A., Al Obaid, K., & Evans, B. A. Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. *Frontiers in microbiology*,6; 2015.
- Villar, M., Cano, M. E., Gato, E., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J. M., de Alegría, C. R., ... & Tomás, M. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: A reappraisal. *Medicine*, 93(5), 2014, 202-210.
- Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol*;49(3):875-82; 2011.
- Valenzuela, J. K., L. Thomas, S. R. Partridge, T. van der Reijden, L. Dijkshoorn, and J. Iredell. Horizontal Gene Transfer in a Polyclonal Outbreak of Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii*:*Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 453; 2007.
- Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative bacteria, In: Murray PR, Baron JE, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press. P 520-32.1995.
- Zhou WQ, Zhang ZF, Shen H, Ning MZ, Xu XJ, Cao XL, et al. First report of the emergence of New Delhi metallo-β-lactamase-1 producing *Acinetobacter junii* in Nanjing, China. *Indian J Med Microbiol*; 31(2):206-7; 2013.
- Zong Z, Zhang X. *bla*_{NDM-1}-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. *J Antimicrob Chemother*; 68(5):1007-10; 2013.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isoladas de pacientes internados em um Hospital Público do município de Dourados/MS afim de identificar a resistência aos carbapenêmicos, buscando contribuir nas medidas de controle de infecção hospitalar.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas de *A. baumannii* em isolados clínicos de pacientes internados em um Hospital Público de Dourados/MS;
- Determinar o perfil de susceptibilidade pelo teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cepas de *A. baumannii*;
- Identificar a presença de carbapenemases por MALDI TOF-MS;
- Investigar a presença dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1} pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

5. ARTIGO

Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

ISSN 0074-0276 *versão impressa*

ISSN 1678-8060 *versão on-line*

* Artigo estruturado segundo normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Acinetobacter baumannii* EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE DOURADOS/MS

XXX¹, XXX², XXX³

Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD- Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. Laboratório de Ciências da Saúde – LPCS. Rodovia Dourados- Itahum Km 12. 798000-000, Dourados-MS.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é responsável por diversos casos de infecções nosocomiais, com elevados índices de morbidade e mortalidade, além de estabelecer prolongados períodos de internação e altos custos para o sistema de saúde. O objetivo do estudo foi caracterizar cepas de *A. baumannii* multirresistentes em um Hospital Público do município de Dourados/MS. As cepas foram coletadas de Janeiro a Dezembro de 2014, identificados pelo sistema automatizado VITEK® (BioMérieux) e confirmadas pelo MALDI TOF-MS. No período do estudo foram isolados 65 cepas de *A. baumannii*, provenientes de 65 pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e postos de atendimentos, provenientes de amostras clínicas de swab retal (21,5%), swab nasal (15,3%), secreção traqueal (36,9%), secreção de dreno (1,5%), material de biopsia (1,5%), cateter (17,1%), secreção otológica (1,5%), secreção da coxa (1,5%), urocultura (7,6%), hemocultura (6,1%). O perfil de susceptibilidade foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI sendo que 96,9% das cepas apresentaram perfil de multirresistência (MDR) a imipenem (MIC \geq 8 μ g/mL e 16 μ g/mL) e 93,8% ao meropenem (MIC \geq 8 μ g/mL e 16 μ g/mL). A investigação da presença de enzimas carbapenemases foi determinada por MALDI TOF-MS que indicou a produção carbapenemases em todas as cepas. A análise genética para a identificação dos genes que codificam carbapenemases, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-58}, foi realizada por PCR. Todas as cepas foram positivas para o gene *bla*_{OXA-51} e 90,7% para o gene *bla*_{OXA-23}. Portanto identificar os genes envolvidos na resistência bacteriana a carbapenêmicos poderá auxiliar em medidas de controle de infecção hospitalar

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, Infecção hospitalar; Resistência bacteriana

Abstract

Acinetobacter baumannii is responsible to several cases of nosocomial infections. Once the increase in cases are related to nosocomial infections comprise high rates of morbidity and mortality, and to establish prolonged periods of hospitalization and high costs to the health system. The aim of the study was to evaluate and characterize strains of *A. baumannii* multidrug resistant in a Public Hospital of Dourados/MS. The bacterial strains of *A. baumannii* were collected from January to December 2014 and were identified by the automated system VITEK® (BioMérieux) and MALDI-TOF MS. During the study period were isolated 65 strains of *A. baumannii* from 65 ICU patients and attendance stations, from clinical samples, as rectal swab (21,5%), nasal swab (15,3%), tracheal aspirates (36,9%) secretion drainage (1,5%), biopsy material (1,5%), catheter (17,1%), ear secretion (1,5%), thigh secretion (1,5%), urine (7,6%), and blood cultures (6,1%). The evaluation of susceptibility profiles was determined by microdilution technique in broth, according to the CLSI wherein 96,9% of the strains were resistant to imipenem (MIC \geq 8 mg / ml and 16 ug / ml) and 61 (93,8%) to meropenem (MIC \geq 8 mg / mL and 16 ug / ml). The investigation of carbapenemases enzyme was determined by MALDI-TOF MS. The genetic analysis was performed by PCR to identify the following encoding genes of carbapenemases, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-58}. All strains were positive for *bla*_{OXA-51} gene and 90,7% for *bla*_{OXA-23} gene. Therefore identify the genes involved in bacterial resistance to carbapenems may assist in control measures hospitalr infection.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, nosocomial infection; bacterial resistance.

INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno Gram-negativo oportunista, responsável por infecções e surtos hospitalares, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) devido ao alto nível de resistência relacionados aos mecanismos intrínsecos e adquiridos e sua fácil adaptação ao ambiente (Chang et al., 2015).

A. baumannii é responsável por pneumonia nosocomial, infecções de feridas, bacteremia, infecção do trato urinário, meningite, endocardite, osteomielite, ceratite (Maragaki, 2008), do sistema nervoso central, e peritonite, que acometem especialmente pacientes imunocomprometidos (Kooti S et al., 2015). Infecções por *A. baumannii* são muitas vezes difíceis de erradicar devido sua capacidade de resistência relacionados aos mecanismos intrínsecos e adquiridos e sua fácil adaptação ao ambiente (Neon et al., 2005; Chang et al., 2015).

Atualmente, no Brasil, o principal problema no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, incluindo *A. baumannii*, é devido a expressão da β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos, cefalosporinas de quarta geração, que são consideradas as mais recentes opções terapêuticas (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) e terceira geração (Kiffer et al., 2003; Moreira et al., 2004; Sader et al., 2001)

Um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases, principalmente as oxacillinases (OXAs), menos frequente que as metalo- β -lactamases (M β Ls) (Irfan et al., 2011). Carbapenemases do tipo OXA são divididos em oito subgrupos, das quais já foram identificados em *A. baumannii*, as enzimas OXA-23, OXA-24, OXA-58, e OXA-51 (Karmostaji et al., 2013), sendo esta última, o gene produtor considerada intrínseco ao genoma de *A. baumannii* (Turton et al., 2006). Vários estudos brasileiros têm relatado a presença destas enzimas responsáveis por ocasionar resistência (Dalla-Costa et al., 2003, Carvalho et al. 2009; Figueiredo, 2011).

Na região da Grande Dourados não há relatos sobre a distribuição de genes que conferem resistência a cepas *A. baumannii*. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos isolados de pacientes internados em um hospital público no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, buscando contribuir na elucidação dos mecanismos de resistência à carbapenêmicos, no tratamento ideal na clínica médica e em medidas de prevenção a surtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-UFGD)

Este projeto foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), com o número do parecer 877.292/ 2014 (Anexo A).

Coleta de dados e isolamento das cepas bacterianas

As cepas foram coletadas de janeiro a dezembro de 2014 de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adulto, neonatal, pediátrica Unidade de Cuidados Intermediários (UCI) e Postos de atendimento de um Hospital Público de Dourados/MS. Dados sobre a identificação bacteriana, coleta das cepas, unidade de isolamento, amostra clínica, faixa etária e sexo dos pacientes foram obtidos utilizando os registros do hospital avaliado.

Caracterização fenotípica dos isolados clínicos

As cepas foram identificadas pelo sistema automatizado VITEK2® (BioMérieux, França), e cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e Ágar Mac Conkey e incubadas durante 24 horas a 37 °C. As culturas que apresentaram crescimento nos meios de cultivos foram armazenadas a -70 °C para posterior extração de DNA. A confirmação da espécie bacteriana e a investigação de carbapenemases foram determinadas por espectrometria de massa MALDI TOF-MS utilizando o antibiótico ertapenem, conforme descrito por Carvalhaes et al., (2013) sendo consideradas produtoras de carbapenemases as cepas como o perfil de hidrólise forte ou hidrólise fraca/tardia em 2 e 4 horas respectivamente.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação do perfil de susceptibilidade foi realizada pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) através técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton em microplacas de 96 poços, *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa padrão em todos os testes de susceptibilidade. Os agentes antimicrobianos testados foram imipenem (0,03 à 32 µg/mL) e meropenem (0,016 à 16 µg/mL). Os resultados foram interpretados por leitura visual com o auxílio do corante Resazurina. *A. baumannii* resistente a carbapenemico (CRAB) foi definido como resistente a imipenem e meropenem (CIM é, ≥ 8 ug/ml e ≥ 16 ug/ml), *A. baumannii* susceptível aos carbapenêmicos (CSAB) (MIC ≤ 2 ug/ml) e *A. baumannii* intermediário a carbapenêmicos (CIAB) (MIC de 4 ug/mL) de acordo com as orientações do

CLSI, 2014.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As cepas bacterianas foram submetidas à extração de DNA através de lise por aquecimento conforme descrito por Chang et al., (2015) com algumas modificações. A amplificação foi realizada utilizando os *primers* específicos (Tabela I) para carbapenemases classificados como classe A, *bla*_{KPC-2}, metalo-betalactamase *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1} e oxacillinases *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, e *bla*_{OXA-58}.

As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 25 µL, utilizando os reagentes GoTaq® Green Master Mix (M712) (USA) de acordo com as informações do fabricante. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (MyCycler-Bio-Rad®) e as condições de ciclagem foram as respectivas: desnaturação inicial a 94 °C por 5', seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45'', extensão a 72 °C por 40'' e extensão final a 72 °C por 7', sendo as temperaturas de anelamento adequadas para cada gene (Tabela 1). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%. Os géis foram corados com GelRed™ (Uniscience/Brasil), e os produtos de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela I. Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos genes codificadores de carbapenemases

Mecanismos de resistência	<i>Primers</i>	Sequências (5' → 3')	Tempo de anelamento em segundos	Peso Molecular do amplicon (pb)	Referências
Carbapenemase Classe A	<i>bla</i> _{KPC-2} F <i>bla</i> _{KPC-2} R	TCT GGA CCG CTG GGA GCT GG TGC CCG TTG ACG CCC AAT CC	55 °C – 40''	399	Cole et al., 2009
Carbapenemase Metallo-betalactamase	<i>bla</i> _{IMP-1} F <i>bla</i> _{IMP-1} R	CTA CCG CAG CAG AGT CTT TGC GAA CAA CCA GTT TTG CCT TAC C	65 °C – 40''	578	Ryoo et al., 2010
Carbapenemase Metallo-betalactamase	<i>bla</i> _{VIM-1} F <i>bla</i> _{VIM-1} R	TCT ACA TGA CCG CGT CTG TC TGT GCT TTG ACA ACG TTC GC	60 °C – 40''	748	Ryoo et al., 2010
Carbapenemase Metallo-betalactamase	<i>bla</i> _{NDM-1} F <i>bla</i> _{NDM-1} R	ATT AGC CGC TGC ATT GAT CAT GTC GAG ATA GGA AGT G	58 °C – 40''	154	Naas et al., 2011
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{OXA-24} F <i>bla</i> _{OXA-24} R	ATG AAA AAA TTT ATA CTT CCTATA TTC AGC TTA AAT GAT TCC AAG ATT TTC TAG C	60 °C – 40''	825	Jeon et al., 2005
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{OXA-51} F <i>bla</i> _{OXA-51} R	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	60 °C – 40''	353	Woodford et al., 2006
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{OXA-58} F <i>bla</i> _{OXA-58} R	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	63 °C – 40''	599	Woodford et al., 2006
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{OXA-23} F <i>bla</i> _{OXA-23} R	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	59 °C – 40''	501	Woodford et al., 2006

RESULTADOS

Coleta de dados e isolamento das cepas bacterianas

De Janeiro a Dezembro de 2014 foram isoladas 65 cepas de *A.baumannii* provenientes de 65 pacientes em um Hospital Público de Dourados/MS. Sendo que 66,1% eram do sexo masculino, conforme pode ser observado na Tabela II.

Nos meses de janeiro, abril e outubro foram isolados o maior número de cepas de *A. baumannii*. Estes resultados podem ser observados na figura 1, o qual demonstra que o mês de outubro apresentou 10 cepas (15,3%), seguido do mês de janeiro com 9 cepas (13,8%) e o mês de abril com 8 cepas (12,3%). É possível observar também que os meses de junho, agosto e novembro foram os meses de menor coleta, com apenas duas cepas de *A. baumannii* coletadas em cada mês.

Tabela II. Características clínicas de 65 pacientes onde foram isoladas as cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB).

Variáveis	N (%)	Colonização N (%)	Infecção N (%)
Gênero			
Masculino	43 (66,1)	40 (61,5)	3 (4,6)
Feminino	22 (33,8)	20 (30,7)	2 (3,0)
Idade			
Neonatos	14 (21,5)	14 (21,5)	-
1– 7 Meses	4 (6,1)	4 (6,1)	-
24-40	3 (4,6)	3 (4,6)	-
40-57	12 (18,4)	6 (9,2)	6 (9,2)
57-67	10 (15,3)	8(12,3)	2 (3,0)
67-79	19 (29,2)	-	19 (29,2)
≥79	3 (4,6)	-	3 (4,6)
Amostra clínica			
Secreção traqueal	24 (36,9)	-	24 (36,9)
Swabs	24 (36,9)	18 (27,6)	6(9,2)
Cateter	3 (4,6)	3(4,6)	-
Hemocultura	4 (6,1)	-	1(1,5)
Material de Biopsia	1 (1,5)	1(1,5)	-
Secreção de Coxa	1 (1,5)	-	1(1,5)
Secreção de Dreno	1 (1,5)	-	1(1,5)
Secreção Otológica	1 (1,5)	-	1(1,5)
Urocultura	6 (9,2)	-	6(9,2)
Unidade de internação			
UTIs-Adulto	39 (63,0)	24 (36,9)	15 (23)
UTI-Neonatal*	14 (21,5)	14 (21,5)	-
UTI-Pediátrica	5 (6,1)	1 (1,5)	4 (6,1)
Postos de atendimento	6 (9,2)	4(6,1)	2 (3,0)
Centro cirúrgico	1 (1,5)	1 (1,5)	-
Total		65	

*Até 28 dias

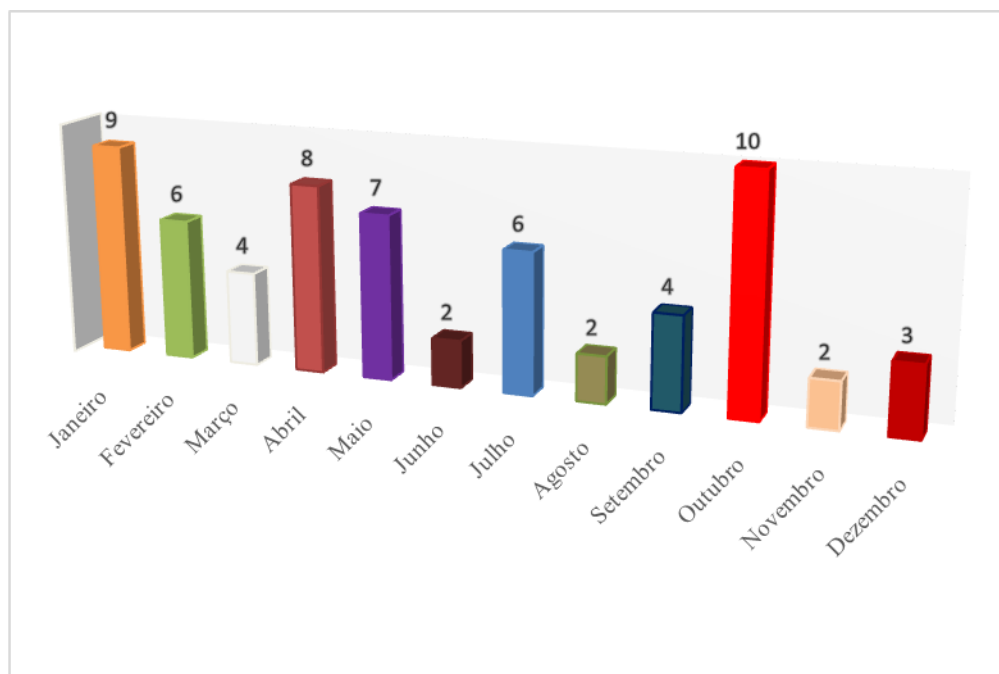


Figura 1. Número de amostras clínicas de *A. baumannii* coletados entre os meses de janeiro a dezembro de 2014.

Foi observado que a prevalência de *A. baumannii* foi maior em indivíduos com faixa etária acima dos 60 anos, demonstrando um alto índice de pacientes idosos acometidos por *A. baumannii*. Por volta de 41,5% se encontram na faixa etária acima dos 60 anos de idade, seguidos de pacientes neonatos (21,5%). Por outro lado, a faixa etária de 24-40 apresentou o menor número de cepas isoladas no período do estudo (4,6%), conforme pode ser observado na figura 2.

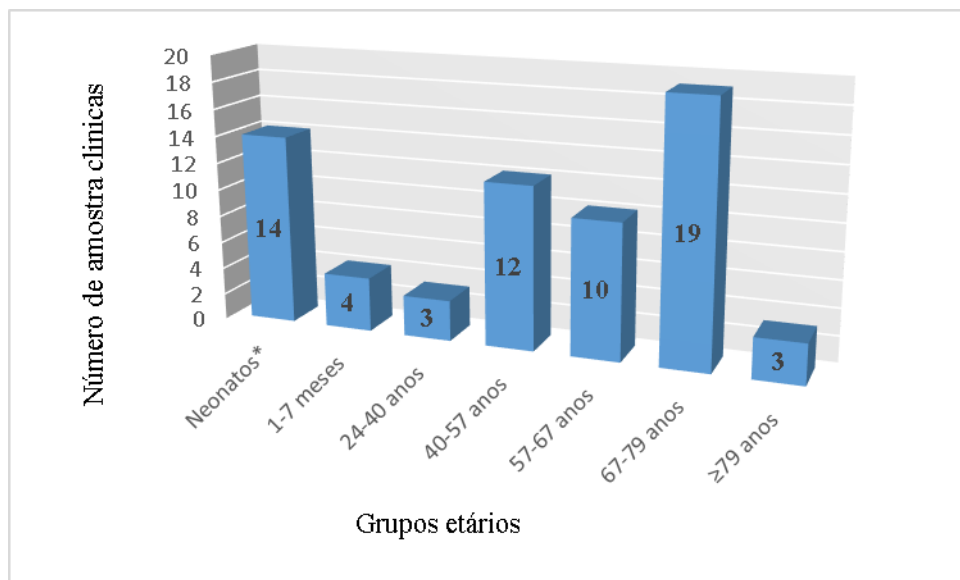


Figura 2. Número de amostras clínicas de *A. baumannii* distribuídas por grupos etários de pacientes internados no HU. * Neonatos até 28 dias.

Dentre os locais de internação, os que apresentaram maior prevalência de amostras coletadas de *A. baumannii* foram as UTIs adultos B e A e UI (Unidade de Intermediária) conforme apresentado na figura 3.

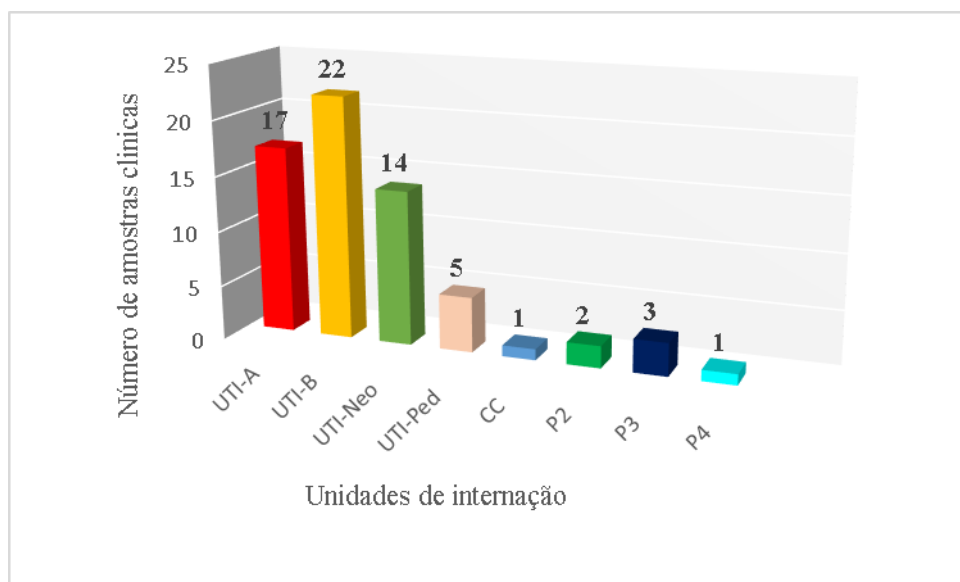


Figura 3. Número de cepas de *A. baumannii* isoladas de diferentes Unidades hospitalares. UTI-A e B: Unidade de terapia intensiva adulto; UTI-Neo: Unidade de terapia intensiva neonatal; UTI-Ped: Unidade de terapia intensiva pediátrica; CC: centro cirúrgico; P2, P3, P4: Postos de atendimento.

As fontes de infecção mais comuns onde foram isoladas as cepas de *A. baumannii* foram secreção traqueal (36,9%), urocultura (9,2%) e hemocultura (6,1%). secreção otológica (1,5%), secreção de dreno (1,5%) e secreção de coxa (1,5%). Para fontes de colonização as amostras de swabs de vigilância (36,9%), cateter (4,6%) e material de biopsia (1,5%). A figura 4 demonstra a quantidade de cepa coletada por amostra clínica.

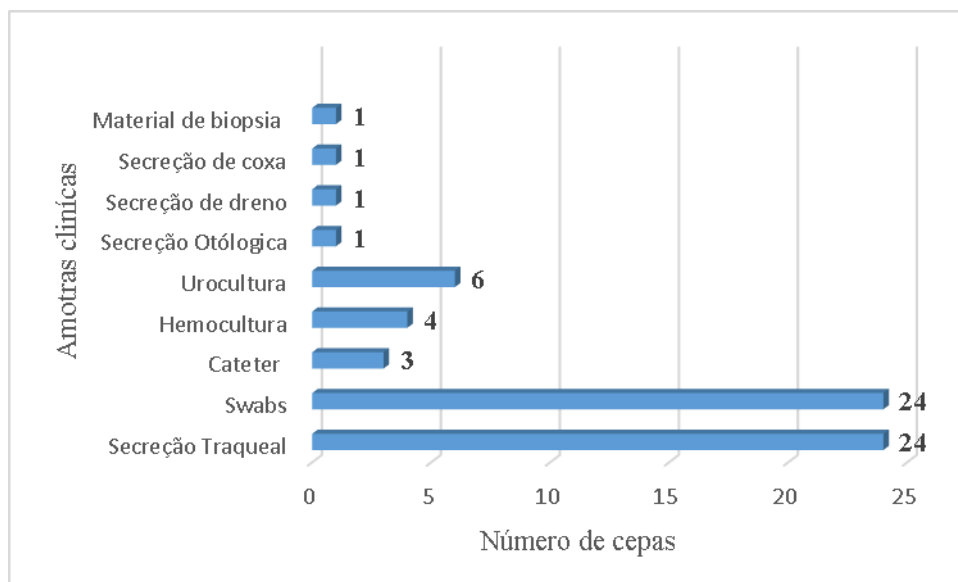


Figura 4. Distribuição de cepas de *A. baumannii* isoladas de amostras clínicas provenientes de pacientes internados em um Hospital público de Dourados/MS.

Caracterização fenotípica dos isolados clínicos

O sistema automatizado VITEK2® identificou 60 (92,3%) cepas como *Acinetobacter baumannii* duas (3,0%) cepas como *Acinetobacter baumannii complex*, uma (1,5%) *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter lwoffii* respectivamente. A confirmação da espécie bacteriana e a investigação de carbapenemases determinada por espectrometria de massa identificou todas as cepas (100%) como *Acinetobacter baumannii*. Além disso identificou cinco cepas (7,6%) como produtoras de carbapenemases em 2 e 4 horas com o perfil de hidrólise forte, seguindo de 60 cepas (92,3%) com hidrólise fraca/tardia. Dessa forma todas as cepas foram consideradas como produtoras de carbapenemases.

Concentração Inibitória Mínima

Dentre os isolados de *A. baumannii*, 63 (96,9%) foram consideradas CRAB (MIC \geq 8 ug/ml \geq 16 ug/ml) ao antibiótico Imipenem. Para Meropenem 61 foram CRAB (93,8%) (MIC \geq 8 ug/ml \geq 16 ug/ml). A tabela III demonstra o resultado obtido com o teste de suscetibilidade a carbapenêmicos.

Tabela III. Avaliação do perfil de susceptibilidade á carbapenêmicos das cepas de *A.baumannii*.

Antimicrobiano	Sensibilidade das cepas de <i>A. baumannii</i> n (%)		
	Resistente	Intermediário	Suscetível
Imipenem	63 (96,9)	1 (1,5)	1 (1,5)
Meropenem	61 (93,8)	3(4,6)	1 (1,5)

Avaliação da presença dos genes de resistência aos carbapenêmicos

Cepas de *A. baumannii* isoladas que apresentaram perfil intermediário ou resistente aos carbapenêmicos foram submetidas a PCR. Todas as cepas foram positivas para o gene *bla*_{OXA-51} (100%) gene intrínseco e utilizado para identificação da espécie e 59 cepas (90,7%) foram positivas para o gene *bla*_{OXA-23}. Os demais genes analisados (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-58}) não foram identificados nas cepas estudadas. A figura 5 e 6 representam a amplificação do gene *bla*_{OXA-23}e *bla*_{OXA-51}, respectivamente.

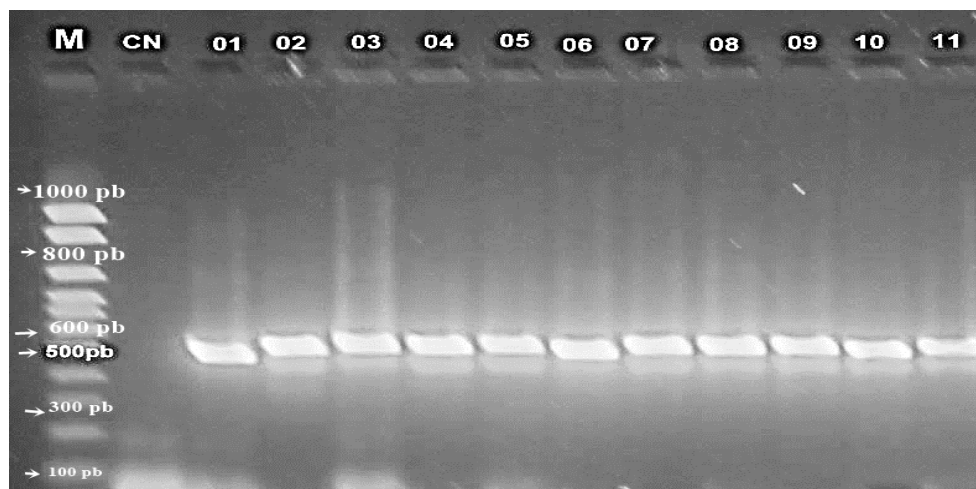


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed® (Uniscience) do gene

*bla*_{OXA-23} amplificado por PCR. Coluna M, marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (Sigma); coluna CN (Controle Negativo), coluna 1 (Controle positivo do PCR) e colunas 2 a 11 cepas de *A. baumannii* positivas no PCR

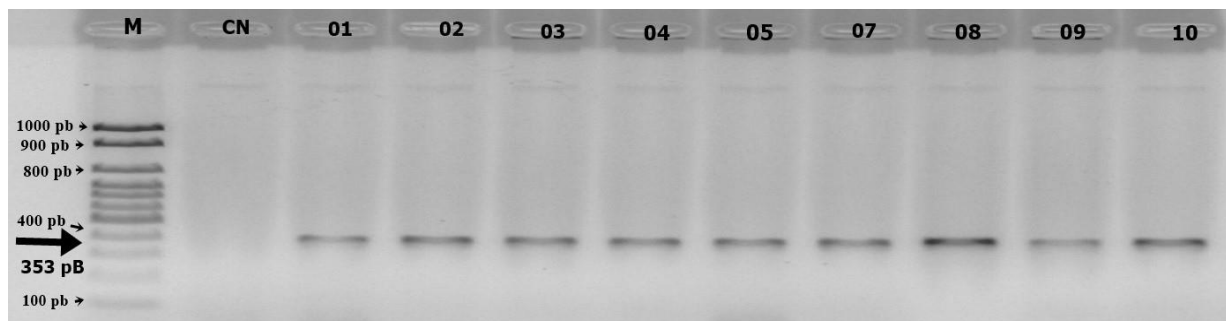


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed® (Uniscience) do gene *bla*_{OXA-51} amplificado por PCR. Coluna M, marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (Sigma); coluna CN (Controle Negativo), coluna 1 (Controle positivo do PCR) e colunas 2 a 10 cepas de *A. baumannii* positivas no PCR.

DISCUSSÃO

Acinetobacter baumannii tornou-se uma importante causa de infecções e colonizações hospitalares em todo o mundo, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos em UTIs, e limitando as opções de tratamento disponíveis (Yang et al., 2016).

O presente estudo avaliou 65 amostras clínicas isoladas de pacientes internados em um Hospital público de Dourados/ MS. Dentre as amostras isoladas na grande maioria foram de secreção traqueal 36,9%, e de swabs de vigilância, sendo amostra de infecção e colonização respectivamente. A prevalência dessas amostras foi maior em indivíduos do sexo masculino 66,1 % com faixa etária acima dos 60 anos (44,6%), internados na UTI-A.

A identificação da espécie bacteriana com o sistema de identificação automatizado utilizado atualmente na microbiologia de diagnóstico, identificou 92,3% das cepas como *Acinetobacter baumannii*, além de outras espécies do gênero. A confirmação da espécie por espectrometria de massa MALDI TOF MS, indicou que todos foram identificados como *A. baumannii* produtor de carbapenemases em 2 e 4 horas com o perfil de hidrólise forte e hidrólise fraca/tardia. Contudo a partir da divergência entre os resultados apresentados pelo sistema de identificação automatizado pode-se confirmar a eficiência do MALDI TOF MS por ser uma ferramenta precisa na identificação microbiana hospitalar, em especial na identificação de

espécies do gênero *Acinetobacter* (Seifert et al., 2007; Rodríguez et al., 2013). A identificação por sistemas automatizados como o utilizado no estudo continua a ser uma problemática (Dubois et al., 2012; Manji et al., 2014; Jamal et al., 2014). Isto pode ser explicado em parte pelo teor de banco de dados limitado, mas também porque os substratos utilizados para a identificação de espécies de bactérias não foram adaptados especificamente para identificar bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter*. Em particular, os três membros clinicamente relevantes do *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. baumannii complex* não podem ser separados por sistemas de identificação comerciais atualmente disponíveis (Peleg et al., 2008).

Os elevados perfis de resistência dos isolados de *A. baumannii* aos antimicrobianos imipenem 96,9% e 93,8% ao meropenem, podem ser ocasionados decorrente do uso indevido de antibióticos em ambientes clínicos, ou de pacientes que não completam o curso de antibiótico prescrito (Lowings et al., 2015), além da extensa prescrição de carbapenêmicos em hospitais, a fim de tratar infecções por *A. baumannii* levou a ocorrências de isolados resistentes ao carbapenemicos (Bagheri et al., 2015). Esses resultados corroboram com os apresentados por Kooti, et al. 2015, que relatou 98,5% de resistência ao imipenem e 99,5% ao meropenem. Assim como no estudo de Goudarzi, et al., 2013 em Teerã, as taxas de resistência de 99% e 91,5% foram relatados ao imipenem e meropenem, respectivamente. No Chile, a resistência a imipenem e meropenem em pacientes de UTIs foi de 76% e 80,2%, respectivamente, durante 2012 (Rivera, 2016). Estes achados reforçam a ideia que o perfil de resistência de cepas *A. baumannii* à carbapenêmicos tem uma tendência crescente que é provavelmente por causa da disseminação de uma possível linhagem altamente resistente (Aljindan et al., 2015).

Os resultados para PCR revelaram que os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23} foram amplamente distribuídos nos isolados clínicos analisados, o que pode ter contribuído para o aumento da incidência de CRAB no hospital investigado (Cortivo et al., 2015). A análise genética indicou que 100% dos isolados de *A. baumannii* continham o gene *bla*_{OXA-51}. Este gene está localizado no cromossomo intrinsecamente de todas as cepas *A. baumannii* (Kooti et al. 2015). Este resultado proporciona provas de que a detecção de *bla*_{OXA-51} pode ser usada como uma maneira simples e confiável de identificação da espécie de *A. baumannii* (Kooti et al. 2015; Turton et al., 2006). Apesar desse gene não estar restrito a espécie de *A. baumannii* o gene *bla*_{OXA-51} está presente em pelo menos a grande maioria das cepas da espécie, entretanto tem havido debates sobre se estão presentes em todos os isolados desta espécie (Turton et al., 2006).

A ocorrência do gene *bla*_{OXA-23} tem sido relatada desde 1985, em isolados de *A. baumannii* e já disseminado em todo o mundo (Coelho et al., 2006; Carvalho et al., 2009; Kock et al., 2013; Evans et al., 2014; Zarrilli et al., 2013). A prevalência do gene *bla*_{OXA-23} neste estudo foi de 90,7% em comparação a outros estudos que investigam surtos de OXA-23 produzido por cepas de *A. baumannii*, a taxa variou de 31% a 94% em diferentes partes do mundo (Shoja et al., 2013). Acredita-se que OXA-23 é responsável pela resistência a carbapenêmicos (Chang et al., 2015; Aljindan et al., 2015). A distribuição de outros genes *bla*_{OXA} em *A. baumannii* é variável, como, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-58} que no presente estudo não obteve resultados, assim como para *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, estes achados corroboraram com os do estudo de Lowings et al., 2015.

Em conclusão é importante considerar *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos como agente etiológico de infecções em hospitais, devido este microorganismo ser um contaminante. No entanto, devido a dificuldade de tratamento e a facilidade com que ele se espalha, deve-se prestar especial atenção à achados deste patógeno e dirigir esforços para o diagnóstico clínico adequado, o tratamento ideal e medidas de prevenção à surtos, especialmente em relação ao uso de antibióticos. Além disso, carbapenemases OXA-23 aparecem como mecanismo que media resistência a carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii*, sendo pouco provável que OXA-51 tem contribuído para a resistência de carbapenemicos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelo espaço cedido, a Fundect, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro e ao Hospital público da região da Grande Dourados pelas amostras cedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljindan, R., Bukharie, H., Alomar, A., & Abdalhamid, B. Prevalence of digestive tract colonization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Saudi Arabia. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 400-406; 2015.
- Bagheri J. S.; Moniri, R.; Firoozeh, F.; Sehat, M.; Dasteh, Y. G. "Susceptibility Pattern and Distribution of Oxacillinases and *bla*_{PER-1} Genes among Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Teaching Hospital in Iran." *Journal of Pathogens*, 2015.

- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- da Silva, Fabiano Pinheiro, and Irineu Tadeu Velasco. Sepse. *Editora Manole Ltda*, 2007.
- Camargo CH, Bruder N. A. Defining resistance in *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex strains. *Antimicrob Agents Chemother*;57(5):2442; 2013.
- Carvalho, Karyne Rangel, et al. "Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil." *International journal of antimicrobial agents* 34.1 (2009): 25-28.
- Carvalhoes, C. G., Cayô, R., Assis, D. M., Martins, E. R., Juliano, L., Juliano, M. A., & Gales, A. C. Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 287-290; 2013.
- Cole J. M., Schuetz A. N., et al. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, n. 2, p. 322–326; 2009.
- Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:756–758. doi: 10.1128/AAC.50.2.756-758.2006.
- Cortivo, Giselle Dall, et al. "Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48.6 (2015): 699-705.
- Chang Y, Luan G, Wang Y, Shen M, Zhang C, Zheng W, Huang J, Yang J, Jia X and Ling B. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chinese teaching hospital. *Front. Microbiol.* 6:910. doi:10.3389/fmicb.2015.00910; 2015.
- Dalla-Costa, Libera M., et al. "Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil." *Journal of clinical microbiology* 41.7 (2003): 3403-3406.

- Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol*;50:2568–2576; 2012.
- Dewhirst, F. E., B. J. Paster, and P. L. Bright. *Chromobacterium, Eikenella, Kingella, Neisseria, Simonsiella, and Vitreoscilla* species comprise a major branch of the beta group P roteobacteria by 16s ribosomal ribonucleic acid sequence comparison: transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to the family *Neisseriaceae* (emend.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:258-266; 1989.
- Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*;27:241–263. doi: 10.1128/CMR.00117-13; 2014.
- García-Quintanilla, M., M. R. Pulido, R. López-Rojas, J. Pachón, and M. J. McConnell. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: *Trends Microbiol*, v. 21, p. 157-63; 2013.
- Gonzalez-Villoria, A. M., & Valverde-Garduno, V. Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *Journal of pathogens*, 2016.
- Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter bumannii* carrying bla oxA type genes isolated from hospitalized patients. *Novel Biomed*;1(2):54–61; 2013.
- Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother*, 66:62-65; 2011.
- Horianopoulou, Maria, et al. "Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit." *Journal of medical microbiology* 55.10: 1435-1439; 2006.
- Huang J., Chen E. Z., Qu H. P., Mao E. Q., Zhu Z. G., Ni Y. X., Han L. Z., Tang Y. Q. Sources of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and its role in respiratory tract colonization and nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. *Chin Med J (Engl)* 126, 1826–1831; 2013.

- Irfan S, Turton JF, Mehraj J, Siddiqui SZ, Haider S, Zafar A, et al. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect* ;78(2):143–8; 2011.
- Jamal, Wafaa, M. John Albert, and Vincent O. Rotimi. "Real-time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria." *BMC microbiology* 14.1 (2014):1.
- Karmostaji A, Najar Peerayeh S, Hatf Salmanian A. Distribution of OXA-Type Class D β -Lactamase Genes Among Nosocomial Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated in Tehran Hospitals. *Jundishapur J Microbiol*;6(5):1–5;2013.
- Kiffer, C.; Hsiung, A; Oplustil1, C; Sampaio, J.; Sakagami1, E. ; Turner, P. ; Mendes, C and the MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria in Brazilian Hospitals:The MYSTIC Program Brazil 2003. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 9(3):216-224; 2005.
- Kooti, Sara, Mohammad Motamedifar, and Jamal Sarvari. "Antibiotic Resistance Profile and Distribution of Oxacillinase Genes Among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz Teaching Hospitals, 2012-2013." *Jundishapur journal of microbiology*, 8.8 (2015).
- Kock, Marleen M., et al. "Prevalence of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens obtained from an academic hospital in South Africa." *Southern African Journal of Epidemiology and Infection* 28.1 (2013): 28-32.
- Lefebvre A, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. Impact of barrier precautions and antibiotic consumption on the incidence rate of acquired cases of infection or colonization with *Acinetobacter baumannii*: A 10-year multidepartment study. *Am J Infect Control* 39: 891-894; 2011.
- Lin MF, Chang KC, Lan CY, Chou J, Kuo JW, Chang CK, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in five proximal hospitals in Taiwan. *Jpn J Infect Dis*; 64(3):222–7; 2011.

- Lockhart, Sr., M. A. Abramson, S. Beekmann, G. Gallagher, S. Riedel, D. Diekema, J. P. Quinn, and G. Doern. Antimicrobial resistance among gram- negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the united states between 1993 and 2004: *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, p. 3352-3359; 2007.
- Manji R, Bythrow M, Branda JA, Burnham CA, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non-*Enterobacteriaceae* Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ;33:337–346; 2014.
- Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*; 46(8):1254–63; 2008.
- Martins AF, Barth AL. *Acinetobacter*spp.multirresistente – um desafio para a saúde pública. *Scientia Medica*:56-62; 2013.
- Molina J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Ribera A, Beceiro A, et al. Clinical Features Of Infections And Colonization By *Acinetobacter* Genospecies 3. *J Clin Microbiol*; 48(12):4623-6; 2010.
- Moradi, J., F. B. Hashemi, and A. Bahador. Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: A Systemic Review of the Published Literature: *Osong Public Health Res Perspect*, v. 6, p. 79-86; 2015.
- Moreira, L. B. Princípios para o uso racional de antimicrobianos. *Revista da AMRIGS*, n. 2, p.73-152, 2004
- Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 16: 35-40; 2010.
- Naast., Ergani A., Carrer A., Nordman P. Real-time PCR for detection of NDM-1 carbapenemase genes from spiked stool samples. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v;55:4038–43; 2011.
- Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification. *PLoS ONE* 10(3): e0122793. doi:10.1371/journal.pone.0122793; 2015.

- Oh, Y. J., S. H. Song, S. H. Baik, H. H. Lee, I. M. Han, and D. H. Oh. A case of fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Korea: *Korean J Intern Med*, v. 28, p. 486-90; 2013.
- Pailhoriès, H., Daure, S., Eveillard, M., Joly-Guillou, M. L., & Kempf, M. "Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex: a relevant alternative to molecular biology?." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 83.2:99-104; 2015.
- Patel G, Huprikar S, Fator SH, SG Jenkins, Calfee DP. Os resultados de carbapenemresistente *Klebsiella pneumoniae* infecção eo impacto de terapias antimicrobianas e adjuvantes. *Controlo Hosp Epidemiol Infect*; 29:1099106. [Http://dx.doi.org/10.1086/592412](http://dx.doi.org/10.1086/592412); 2008.
- Poirel L., Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12, 826–836; 2006.
- Pogue JM, Mann T, Barber KE, Kaye KS. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, surveillance and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*;11(4):383-93; 2013.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broadspectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>; 2015.
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., Dabos, L., Vay, C., & Famiglietti, A. [Frequency and antimicrobial resistance of *Acinetobacter* species in a university hospital of Buenos Aires City]. *Revista Argentina de microbiologia*, 46(4), 320-324; 2013.
- Ryoo N. H., Ha J. S., Jeon D. S., Kokean J. R. K. Prevalence of Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 13, n.. 4, 2010.
- Sader, H. S., R. N. Jones, A. C. Gales, J. B. Silva, A. C. Pignatari, and S. P. G. L. America. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001: *Braz J Infect Dis*, v. 8, p. 25-79; 2004.

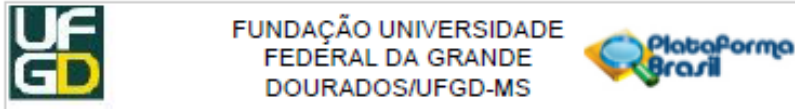
- Seifert, H., L. Dijkshoorn, J. Gielen, A. Nemec, K. Osterhage, M. Erhard, e O. Krut. Abstr. 107 Gen. Meet. Sou. Soe. Microbiol., Abstr. C-172. *American Society for Microbiology*, Washington, DC. 2007.
- Shoja S, Moosavian M, Peymani A, Tabatabaiefar MA, Rostami S, Ebrahimi N. Genotyping of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from tracheal tube discharge of hospitalized patients in intensive care units, Ahvaz, Iran. *Iran J Microbiol*; 5(4):315–22; 2013.
- Sugimoto, C., Y. Isayama, R. Sakazaki, and S. Kuramochi. Transfer of *Haemophilus equigenitalis* Taylor et al. to the genus *Taylorella* gen. nov. as *Taylorella equigenitalis* comb.nov. *Curr. Microbiol.* 9:155-162; 1983.
- Tiwari,V.,Kapil,A.,andMoganty,R.R.Carbapenem-hydrolyzing *Acinetobacterbaumannii* isolatedfrom India. *Microb.Pathog.* 53, 81–86.doi:10.1016/j.micpath.2012.05.004; 2012.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*; 44(8):2974–6; 2006.
- Vanegas, Johanna Marcela, et al. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia." *Biomédica* 35.4: 522-30; 2015.
- Woodford N., Ellington M. J., Coelho J. M., Turton J. F., Ward M. E., Brown S., et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 27, n. 4, p. 351-3, 2006.
- Yang, Y., Wang, J., Fu, Y., Ruan, Z., & Yu, Y." *Acinetobacter seifertii* Isolated from China: Genomic Sequence and Molecular Epidemiology Analyses." *Medicine*. 95.9; 2016.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*;41:11–19. doi: 10.1016; 2013.

6. CONCLUSÃO.

A emergência de microrganismos multirresistentes, ultimamente remetem à reflexão e definições de atitudes em todas as atividades executadas nos ambientes de assistência à saúde ou a eles relacionados. Os avanços tecnológicos na utilização de testes moleculares, tais como os ensaios de PCR, é que os genes de resistência que circulam em situações clínicas podem ser determinados como tal, onde com testes fenotípicos não é possível. Além disso, uso de antimicrobianos proporcionam redução da mortalidade, porém, como consequência um aumento da morbidade e da resistência bacteriana. A emergência de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos impõe um rigor à adesão as medidas básicas de prevenção, e de transmissão de microrganismos multirresistentes

5. ANEXO

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Continuação do Parecer: 077.292

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 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.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a ocorrência de Enterobactérias produtoras de carbapenemase (KPC) isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Dourados, visando identificar os fatores de riscos associados a aquisição de infecções causadas por estas bactérias.

avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos benefícios parece ser uma proposta que possibilitará auxiliar ações de vigilância em saúde. A avaliação dos riscos inerentes à coleta das amostras dos pacientes é inexistente. No entanto, a pesquisa é retrospectiva, uma vez que o material já foi coletado em procedimento padrão da instituição em que será realizada a pesquisa, o que torna suficiente a avaliação ora apresentada no protocolo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e os resultados da pesquisa podem contribuir com ações de vigilância em saúde no HU. A pesquisadora realizou adendo no protocolo (embora sem documento de encaminhamento) que corresponde ao aumento no número de participantes na pesquisa. O aumento seria de 300 participantes mudança no n de 200 para 500 participantes).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Descreve suficientemente o procedimento para obtenção do TCLE, além de versão reformulada do TLE (TCLE 12.11.2014).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores descreveram detalhadamente o procedimento para obtenção dos TCLEs de forma a documentar, caso a caso, a impossibilidade da sua obtenção. No tocante a esse ponto, o

Endereço: Rua Melvin Jones, 940
Bairro: Jardim América CEP: 79.805-010
UF: MS Município: DOURADOS
Telefone: (67)3410-2853 E-mail: cep@ufgd.edu.br

Página 02 de 03



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UF GD-MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia molecular de bactérias gram negativas produtoras de carbapenemases isoladas em Hospitais de Dourados-MS.

Pesquisador: Simone Simionato

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: 4

CAAE: 05666812.3.0000.5160

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Patrocinador Principal: FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIÊNCIA E TECN. DO ESTADO DO MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 877.292

Data da Relatoria: 09/09/2014

Apresentação do Projeto:

O presente projeto propõe realizar um estudo de epidemiologia molecular de cepas de Enterobactérias produtoras de KPC isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário HUJ da Universidade Federal da Grande Dourados (UF GD). 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 microorganismos 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. ao ambiente hospitalar sobre a aquisição destes agentes

Endereço: Rua Melvin Jones, 940
Bairro: Jardim América CEP: 79.803-010
UF: MS Município: DOURADOS
Telefone: (87)3410-2853 E-mail: cep@ufgd.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UGD-MS



Continuação do Parecer: 077.292

protocolo está conforme as exigências pregadas pela Res CNS 466/2012 para a dispensa do TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

DOURADOS, 19 de Novembro de 2014

Assinado por:
Paulo Roberto dos Santos Ferreira
(Coordenador)



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo e política

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão somente através de convite. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos em inglês. Inglês de baixa qualidade é a principal causa de atraso na publicação; então, sugerimos aos autores que tenham inglês como língua estrangeira submeterem seus manuscritos à verificação de alguém com o inglês como língua nativa e, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às *Memórias* requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação do material.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos no seguinte link:<http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Com este serviço, você poderá submeter manuscritos e verificar o conteúdo de sua submissão. Os arquivos eletrônicos serão usados para avaliação editorial e arbitragem online. Além disso, a decisão editorial do manuscrito será comunicada diretamente a você.

Usando o serviço de submissão eletrônica, você vai garantir rapidez e segurança no envio de seu manuscrito e agilizar o processo de avaliação.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista de acesso aberto e não cobra taxas para a submissão e avaliação de artigos.

Produtos naturais

Enfatizamos que artigos sobre Produtos Naturais e Investigações farmacológicas devem satisfazer os seguintes requisitos.

Qualquer extrato natural, fração ou composto deve ser totalmente caracterizado e a informação relacionada a origem, localização e período/ano que foi coletado, deve ser fornecida. Especialmente, o extrato em estudo, deve ser fracionado e as substâncias ativas deste produto natural devem ser identificadas.

Técnicas de isolamento e purificação devem ser descritas em detalhes.

Autores devem declarar em seus artigos que o material em estudo é livre de endotoxinas.

Ensaio de Citotoxicidade com células normais devem ser apresentados

Materiais de plantas (assim como de outros organismos) devem ser devidamente identificados. O nome científico deve aparecer (em itálico), o autor deste nome e o nome de família devem ser fornecidos; mencionar quem identificou o material. O manuscrito deve incluir referências aos espécimes da planta (depositada em herbário regional) ou ao material examinado;

Artigos que tratam de vigilância biológica de séries de extratos descaracterizados de plantas ou outros organismos não serão considerados para publicação nas Memórias.

Investigações farmacológicas de extratos requerem detalhamento na caracterização do extrato. O perfil cromatográfico (e.g., HPLC com de sinais identificados) deve ser realizado, ou a informação qualitativa e quantitativa em componentes ativos e típicos deve ser fornecida;

Artigos meramente descritivos não serão aceitos. As Memórias só consideram manuscritos em que conclusões são baseadas em estatísticas adequadas. Em cada caso os controles positivos (substâncias ativas de referência) devem ser utilizados e a dependência da dose/atividade devem ser demonstrada;

Qualquer estudo envolvendo indivíduos deve ser apresentado Aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número de protocolo deve ser informado;

Trabalhos experimentais com animais, referências devem ser feitas aos princípios de cuidados com os animais de laboratório ou regulamentos semelhantes e a aprovação do comitê de ética local;

Estudos que envolvem plantas da Biodiversidade brasileira devem ter autorização para acesso a recursos genéticos, e se for o caso, acesso também a associação de conhecimento tradicional. O número da autorização deve ser informado.

Submissão de Sequencias

Informações sobre sequencias genéticas relatadas no manuscrito, devem ter seu número de acesso GeneBank mencionadas no manuscrito.

O manuscrito deve ser preparado de acordo com as instruções aos autores.

Os autores que submetem um manuscrito à apreciação compreendem que, se aceito para publicação, transferem o direito exclusivo do manuscrito às Memórias, incluindo o de reprodução em todas as formas e meios de comunicação. A revista não recusará aos autores solicitação razoável de permissão para reproduzir qualquer contribuição.

No caso de ensaios clínicos a obrigatoriedade de informar o número do registro na Plataforma REBEC.

Informamos que os trabalhos submetidos às Memórias são encaminhados a uma triagem para detecção de Plágio através do uso de um software. Ferramenta utilizada na prevenção de plágio profissional e outras formas de má conduta acadêmica.

Todos os autores devem assegurar e garantir que as pesquisas relatadas não são resultados de má conduta tais como dados produzidos, falsificação, plágio ou duplicidade. No caso de confirmação de má conduta na pesquisa, emitiremos uma notificação de retratação para corrigir o registro científico.

Favor consultar o Singapore Statement em: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>.

Todos os estudos que envolvem seres humanos de ter a aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número do Protocolo deve ser fornecido.

Trabalhos que envolvem animais experimentais devem fazer referência aos princípios de cuidados com animais de laboratório, ou regulamentos semelhantes e aprovação do comitê de ética local.

Manuscritos submetidos as Memórias serão submetidos a revisão de Inglês “Premium Editing”

pela empresa American Journal Experts que propõem sugestões.

Declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados em qualquer outro meio previamente.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou consultar a home-page (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>) ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2562.1222), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado, figuras legendadas e referências. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidas juntas em único arquivo. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O MANUSCRITO DEVE SER ORGANIZADO NA SEGUINTE ORDEM:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: nome do autor, seção, departamento, laboratório, instituição e localização geográfica (cidade, estado e país); endereço completo somente do autor correspondente.

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus

.

Fonte de financiamento: Indicar as fontes de apoio financeiro e a mudança de endereço.

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, além de especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do

trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com o **sobrenome do primeiro autor**.

NO TEXTO USE O SOBRENOME DOS AUTORES E A DATA:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910)

Com dois autores, é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912)

Quando há mais de dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

Ao final do trabalho, use os seguintes estilos de referências:

REVISTAS

1. Artigo de periódico padrão

1.1. Impresso

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: 284-287.

1.2.

On

line

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: e12140307.

1.3. DOI

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK 2009. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.a2752.

2. Organização como autor

Diabetes Prevention Program Research Group 2002. Hypertension, insulin and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 40: 679-686.

1. Autores pessoais e organização como autor

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ, Alf-One Study Group 2003. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 169: 2257-2261.

2. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C 2002. Tolerability and safety of frovatriptan with short and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 42 (Suppl. 2): S93-S99.

3. Artigo com errata publicada

Malinowski JM, Bolesta S 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 22: 1151-1168. Erratum in *Clin Ther* 2001 23: 309.

6. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK 2002. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* Nov 15 100: 3828-3831. Epub 2002 Jul 5.

LIVROS E OUTRAS MONOGRAFIAS

1. Autor pessoal

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA 2002. *Medical microbiology*, 4th ed., Mosby, St. Louis, 255 pp.

2. Capítulo em um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM 2002. Chromosome alterations in human solid tumors. In B Vogelstein, KW Kinzler (eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, p. 93-113.

3. Anais de Conferências

Harnden P, Joffe JK, Jones WG 2002. Germ cell tumours. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference, 2001 Sep 13-15, Leeds, UK, Springer, New York, 102 pp.

4. Dissertação e Tese

Borkowski MM 2002. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans*, PhD Thesis, Central Michigan University, Michigan, 78 pp.

MATERIAIS NÃO PUBLICADOS

1.No prelo

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M 2002. Signature of balancing selection in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.

2. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB 2002. Anderson's electronic atlas of haematology [CD-ROM]. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

4. Artigo de periódico na Internet

Aboud S 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet] [cited 2002 Aug 12] 102. Available from: nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle.

ILUSTRAÇÕES

Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto. Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco

em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) como na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Como uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

OUTROS FORMATOS E ESTILOS DE ARTIGOS

Notas Técnicas: Notas Técnicas devem comunicar sucintamente novas técnicas individuais ou avanços técnicos originais. A nota inteira deve ocupar no máximo três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas (que significa em torno de 10 laudas em espaço duplo). O texto não deve ser dividido em seções. Assim, o estado da arte deve ser muito brevemente apresentado e resultados devem ser ligeiramente apresentados e discutidos ao mesmo tempo. Tabelas e figuras complementares poderão ser publicadas como dados complementares. Referências devem ser limitadas às essenciais e citadas no final da nota, com o mesmo formato, como em artigos completos. Devem ser apresentados um resumo breve e três palavras-chave.

Comunicações breves: devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, com o mesmo formato usado em artigos completos. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126:

36-47, ou no website: <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>, sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

No caso de ensaios clínicos, é obrigatório informar o número de inscrição da plataforma REBEC. Os autores também devem fornecer uma declaração de que os dados/ resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados anteriormente.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

1. uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista e assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;
2. uma declaração de copyright fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor correspondente;
3. Taxas: a revista não cobra taxas para publicação;
4. Provas: serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.