III Congresso Nacional de Microbiologia Clínica On-line

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PRELIMINAR DE UM BACTERIÓFAGO ESTRITAMENTE LÍTICO PARA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE

BRUNA RIBERA GUERRERO; MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA; VICTOR MANUEL CARDOSO FIGUEIREDO BALCÃO

RESUMO

As bactérias têm-se tornado cada vez mais resistentes devido ao uso incorreto e exacerbado de antibióticos, gerando infecções persistentes. As enterobactérias, pertencentes a microbiota de seres humanos e animais têm um enorme potencial de desenvolver doenças quando estão em situações de disbiose. Dentre elas, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae,* sobretudo as cepas produtoras de carbapenemase, uma enzima que as torna ainda mais resistentes a maior parte dos antibióticos. Além disso, estão constantemente envolvidas em infecções hospitalares, acometendo principalmente o trato urinário, pulmões e se espalhando pela corrente sanguínea, levando a quadros de sepse. Tendo em vista a falta de novos antibióticos com potencial terapêutico para combatê-las, ressurgem como alternativa o uso de bacteriófagos, vírus altamente específicos que possuem a capacidade de eliminar apenas bactérias-alvo, controlando a infecção de forma a minimizar o comprometimento sistêmico do indivíduo. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi realizar o isolamento e a caracterização físico-química preliminar de um bacteriófago lítico para *Klebsiella pneumoniae* NCTC-13439, produtora de carbapenemase. Para isso coletaram-se amostras ambientais, as quais foram utilizadas nas etapas de enriquecimento, isolamento, propagação e purificação, além da determinação do título fágico. Com o fago já isolado foi realizada a caracterização físico-química preliminar, visando análise espectrofotométrica por varredura espectral UV-Vis, determinação do coeficiente de extinção molar, determinação do perfil de proteínas estruturais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e características morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O título fágico obtido foi de $4{,}62x10^{26}$ UFP/mL, na varredura espectral UV-Vis a absorvância máxima observada ocorreu no comprimento de onda de 256 nm, enquanto o ponto de menor abosrvância foi de 244 nm, relacionado a alta concentração de vírions e baixa concentração de debris celulares e outros interferentes proteicos citoplasmáticos. O coeficiente de extinção molar obtido foi de $\varepsilon_{vB_KpnS_Uniso1E} = 3.792x10^{-26}$ $(PFU/mL)^{-1} \bullet cm^{-1}$, na eletroforese SDS-PAGE, os pesos moleculares das proteínas estruturais variaram entre 34 - 169 kDa. As partículas fágicas isoladas mostraram-se pertencentes à ordem Caudovirales e, muito provavelmente à família *Siphoviridae*, mas a confirmação apenas pode ser obtida após o sequenciamento de seu genoma.

Palavras-chave: Enterobactéria; Resistência; Antibiótico; Fago; Vírus.

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos foram um advento inovador, visto que combatiam infecções múltiplas com eficiência e de forma prática, porém com o passar do tempo estão sendo utilizados de

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759

forma abusiva e incorreta, fazendo com que as bactérias se adaptem, evoluam e sejam selecionadas a ponto de resistirem à maior parte dos antibióticos disponíveis, tornando o tratamento custoso e potencialmente tóxico (ALÓS, 2014). Devido à dificuldade em encontrar outros agentes antimicrobianos capazes de combaterem as chamadas "superbactérias", associado à diminuição do investimento em pesquisas para esse fim, terapias alternativas tornam-se extremamente necessárias, trazendo de volta ao foco os bacteriófagos, que já haviam sido descobertos antes mesmo da penicilina (PAIVA *et al.,* 2013). Os bacteriófagos são vírus altamente específicos, pois possuem a capacidade de infectar e destruir apenas bactérias-alvo, tornando a infecção de células humanas improvável (PRINCIPI; SILVESTRI; ESPOSITO, 2019). São ubíquos no meio ambiente, encontrando-se no solo, lagos e esgotos, onde normalmente suas bactérias hospedeiras também estão. Por serem entidades naturais e renováveis, diminuem a preocupação relacionada às chances de resistência bacteriana (NECA, 2022). Apresentam a vantagem de controlar a infecção sem causar efeitos colaterais à microbiota, pois não possuem metabolismo próprio, sendo naturalmente eliminados pelo organismo, quando as células bacterianas hospedeiras são extinguidas (HARADA *et al*., 2022). São utilizados em diversos tratamentos, tanto para combater bactérias fitopatogênicas que acometem plantações (PEREIRA *et al.*, 2021), quanto para tratar infecções multirresistentes em animais e humanos (BALCÃO *et al.*, 2022). Atualmente, estudam-se sistemas *delivery* para que cheguem ao local da infecção sem que sejam eliminados pelo sistema imunitário, podendo ser aplicados por via intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, tópica ou inalatória (QADIR; MOBEEN; MASSOD, 2018). A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, frequentemente associado a infecções de cunho hospitalar, tendo em vista sua resistência em superfícies abióticas como materiais cirúrgicos, comumente relacionados a entubação (DANTAS; GURJEL, 2021). Considerando ser pertencente à família *Enterobacteriacea,* é comensal na microbiota de humanos e animais, encontrando-se presente mais expressivamente no trato gastrointestinal e nasofaríngeo (RAMPHAL; AMBROSE, 2006). Devido ao seu caráter oportunista, causam infecções principalmente em neonatos e em organismos imunossuprimidos. Quando em condições de disbiose, podem desencadear diferentes enfermidades dependendo da espécie acometida, sendo as principais manifestações clínicas relacionadas ao trato geniturinário, pulmões, pele, podendo levar a quadros de sepse quando atingem a corrente sanguínea (MOXLEY, 2013). Os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação, isso faz com que as bactérias desenvolvam diferentes mecanismos de defesa, podendo adquirir a capacidade de degradar ou inativar o antibiótico, mudar a permeabilidade da membrana celular impedindo sua entrada na célula, ou mutando a ponto de não se adequar mais ao alvo de um determinado antibiótico de modo que não seja afetada (LIMA; BENJAMIN; SANTOS, 2017). O grupo das enterobactérias, sobretudo a *Klebsiella pneumoniae*, possuem como mecanismo de resistência a produção de carbapenemase, beta-lactamase de espectro ampliado, tornando o tratamento normalmente utilizado insuficiente para combater essas infecções, inativando antibióticos da classe dos carbapenêmicos (terminados em penem) e princípios ativos de beta lactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas (SIEBERT *et al.,* 2014). Neste cenário, o isolamento de novos bacteriófagos vem se tornando uma alternativa viável, em virtude de possuírem diversas vantagens em relação aos antimicrobianos convencionais, além de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de antibióticos perderem investimento para tratamentos de doenças crônicas que dão mais retorno financeiro para a indústria farmacêutica (KARUMIDZE *et al.,* 2013). Portanto, a elaboração de coquetéis contendo bacteriófagos com características conhecidas, devidamente identificados e caracterizados, visto que cada vírus possui comportamentos diferentes em relação à sua atividade lítica, é de extrema importância para combater com maior eficiência e segurança infecções causadas por bactérias multirresistentes (EL-SHIBINY; EL-SAHHAR, 2017). Essa abordagem terapêutica utilizando bacteriófagos já é muito comum em países como Polônia e

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759

Geórgia, atualmente no Brasil são permitidas apenas pesquisas sobre esse fim (SOUSA, 2020). Por esse motivo, o presente trabalho visa contribuir positivamente com a divulgação dessa ferramenta para tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, incentivando pesquisas alternativas ao uso de antibióticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologia utilizada foram realizada de acordo com o trabalho publicado por Balcão et al. (2022), Silva *et al*. (2020) e Harada *et al.* (2022). **Enriquecimento:** O isolamento foi realizado a partir do enriquecimento de 50uL de uma alíquota do esgoto do Hospital Veterinário da Universidade de Sorocaba, adicionando-se a mesma quantia de meio de cultura TSB 2X (Trypticase Soy Broth 2X) mais 5 mL da bactéria hospedeira, sendo incubado a 37 °C por 24h. ***Spot test:*** Para constatar a presença de bacteriófagos líticos, foi realizado um *spot test* (teste da gota). Uma gota de 50 uL do enriquecimento foi aplicada num tapete bacteriano (4 mL de *Top Agar (Molten)* mais 100 uL de suspensão bacteriana) em uma placa de Petri com meio nutritivo TSA (Tryptic Soy Agar). A placa foi incubada nas mesmas condições. **Isolamento:** O isolamento consistiu em molhar a ponta de um palito estéril na solução obtida e espalhar, com uma tira de papel filtro, na placa de Petri contendo tapete bacteriano, com o objetivo de esgotar a solução para que as placas de lises se mostrassem separadamente. A placa foi incubada nas mesmas condições, sendo o processo foi repetido por 4 vezes, sempre escolhendo uma lise isolada, que foi passada de uma placa para outra, até a obtenção de morfologias líticas semelhantes.**Propagação:** O bacteriófago isolado foi propagado através da técnica do palito estéril, mergulhado na suspensão fágica e usado para espetar em linha numa placa de Petri contendo uma camada de tapete bacteriano, e espalhado com papel filtro, usando 20 placas de Petri de 90 mm de diâmetro. As placas de Petri foram incubadas durante a noite à 37 °C. Após incubação, 5 mL de tampão fágico SM (NaCl 100 mM; $MgSO_4.7H_2O$ 8 mM; Tris-Cl (1 M, pH 7,5) 50 mM; gelatina 0,002% (m/v) foram adicionados a cada placa e as mesmas incubadas novamente durante a noite a 4 °C. Após esse período foi feita a **Purificação**: Foram adicionados 9 mL da suspensão obtida forma centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos com 1 mL de clorofórmio, o sobrenadante foi coletado e filtrado através de filtros de 0,20 µm, com o auxílio de uma seringa de 5 m, para remoção de células bacterianas ou debris. **Determinação do Título Fágico:** Foram preparadas diluições sequenciais de 50 uL da suspensão de bacteriófagos em 450 µL de tampão fágico SM. Três gotas de 10 µL de cada diluição foram plaqueadas sobre o tapete bacteriano, e as placas são incubadas a 37 °C por 4 h, possibilitando a contagem das placas de lise fágicas para a obtenção do título fágico através da equação:

$$Título\ fágico\ \left(\frac{UFP}{mL}\right) = UFP\ x\ \frac{1}{Diluição}\ x\ \frac{1}{V_{inóculo}(mL)}.$$

Varredura Espectral UV Vis: Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 200 µL da suspensão se bacteriófagos e 1800 µL de tampão fágico SM, e a absorvância lida no espectofotômetro entre 190 nm e 1100 nm. Isso é feito para a determinação do ponto máximo e mínimo de absorção, procedimento descrito por Rios *et al*., (2018) e Silva *et al*., (2020). Coeficiente de extinção molar: Foram preparadas cinco diluições em tampão fágico (até um volume total de 2000 µL), usando diferentes volumes

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759

de suspensão concentrada dos bacteriófagos (10, 25, 50, 100, 150 e 200 µL). As diluições foram lidas no espectofotômetro ao comprimento de onda que produziu a máxima absorvância das partículas fágicas, determinada pela varredura UV-VIS, e a 320 nm (comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos das partículas fágicas). Ajustou-se depois a equação de Beer-Lambert para obter o coeficiente de extinção molar das partículas bacteriofágicas isoladas. **Eletroforese SDS-PAGE:** A suspensão contendo bacteriófagos fo adicionada a um volume igual (500 µL) de tampão de disrupção (1,51% (m/v) Tris-Base; 0,5% (v/v) □-mercaptoetanol; 4% (m/v) SDS; 10% (v/v) glicerol; e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) em um tubo Eppendorf® (com a sua tampa previamente perfurada por uma agulha aquecida) e aquecido a 100 °C durante 10 min. Em seguida, realizou-se a análise eletroforética do sobrenadante das amostras (20 µL) que são colocadas em poços ao lado dos marcadores de peso molecular (5 µL de *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com padrões de proteínas com pesos moleculares entre 10 kDa e 250 kDa) que servirão de guia para a análise das proteínas. O gel de poliacrilamida, preparado pela polimerização de acrilamida e bisacrilamida (gel de concentração com 5% (m/m) acrilamida-bisacrilamida / gel de separação com 12% (m/m) acrilamida-bisacrilamida) corridos a uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 60 min, sendo que após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e fotografados em alta resolução para análise posterior. **Microscopia Eletrônica de Transmissão:** Para essa análise foram preparadas grades de cobre de 3 mm de diâmetro (*Ultrathin Formvar/Carbon on a 200 mesh copper grid, Electron Microscopy Sciences*, Hatfield PA, EUA), contendo a solução concentra de bacteriófagos. A fim de promover a adesão da amostra na sua superfície as grelhas foram previamente submetidas ao procedimento de descarga luminescente, com corrente elétrica de 15 mA, carga negativa e 25s de descarga. A coloração das amostras foi efetuada através da aplicação de 3 µL de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m), deixando-se secar ao ar. Após 30s, o excesso de solução de acetato de uranila foi cuidadosamente removido utilizando papel filtro convencional. Partículas do fago após a coloração negativa com acetato de uranila (Sigma-Aldrich, St.Louis MO, EUA) a 2% (m/m) e pH 7, seguindo o procedimento descrito por (Balcão *et al.* 2022) foram analisados pela técnica de microscopia eletrônica em um Microscópio Eletrônico de Transmissão de JEOL (modelo JEM 2100, Tokyo, Japan), envolvendo um filamento LaB6, operado a 200 kV e com resolução de 0,23 nm; Câmera de alta resolução CCD da GATAN Inc. (modelo ORIUS™ 832.J4850 SC1000B, Pleasanton CA, U.S.A.) com uma resolução de 11 Mp (4.0 x 2.7 k pixels / 9x9 µm2) foi utilizado para aquisição das imagens digitais, pelo software Gatan Microscopy Suite (Digital Micrograph from Gatan Inc., version 2.11.1404.0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento de um bacteriófago sugere-se a coleta de águas residuais, visto que se encontram onde suas bactérias hospedeiras também estão, portanto foi coletada uma amostra de 50 mL do esgoto do hospital veterinário da Universidade de Sorocaba, devido a *Klebsiella pneumoniae* ser uma bactéria constantemente associada a infecções hospitalares, acometendo tanto humanos quanto animais. A amostra foi enriquecida com TSB 2X (meio de cultura mais concentrado) junto a uma alíquota da bactéria hospedeira, com o objetivo de aumentar a concentração de partículas fágicas. Após a etapa purificação, 50 uL da solução purificada foi pingada em uma placa de Petri contendo tapete bacteriano para a realização do *spot test* (teste da gota), onde foi constatada a presença de bacteriófagos estritamente líticos para *Klebsiella pneumoniae* NCTC-13439 produtora de carbapenemase, como pode ser observado na Figura 1. Após a constatação da presença de fagos, iniciou-se o processo de isolamento, apenas uma lise da primeira placa foi selecionada e picada em uma segunda placa e assim sucessivamente, o

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759

processo foi repetido quatro vezes até à obtenção de uma placa de Petri contendo lises fágicas com morfologias semelhantes, indicando que o isolamento foi bem-sucedido (Figura 2). Apenas uma lise da placa contendo morfologias semelhantes é passada para 20 placas de Petri contendo o tapete bacteriano, com o auxílio de palito e tiras de papel de filtro estéreis, após a incubação nas mesmas condições são adicionados 5 mL de tampão fágico em cada placa, e mantidas a 4 °C por mais 24 h. Após esse período de tempo, o tampão foi recolhido e passou por mais uma etapa de purificação, até à obtenção da suspensão final do bacteriófago denominado vB_KpnS_Uniso1E. Para a determinação do título fágico, as diluições seriadas da solução concentrada de bacteriófagos obtida foi plaqueada em ágar de dupla camada contendo a cepa da bactéria hospedeira. Foram determinados os números das unidades formadoras de placas (UFPs) para cada diluição, visando a quantificação dos títulos das suspensões estoque do bacteriófago isolado. Após a contagem das placas de lise, obteve-se o título fágico de $4{,}62x10^{26}$ UFP/mL, um resultado considerado muito alto, devido às lises fágicas se mostrarem incontáveis até à décima sétima diluição (Figura 3).

Figura 1. Placa de Petri contendo *spot test* do enriquecimento.

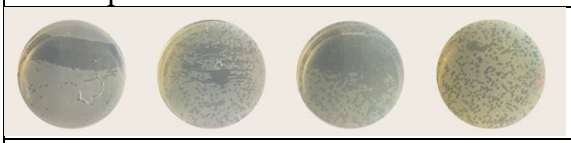

Figura 2. Sequência de placas utilizadas no isolamento fágico.

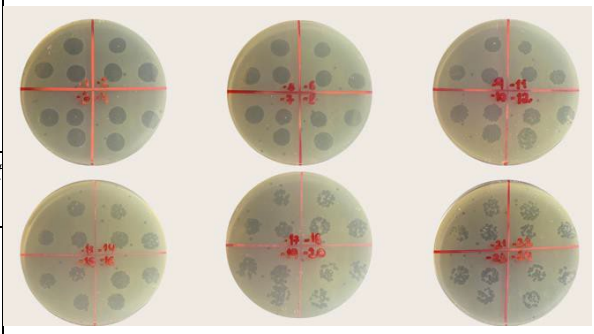

Figura 3. Placas de Petri contendo as diluições para a obtenção do título fágico.

Com a realização da varredura espectral na região UV-Vis da suspensão do bacteriófago vB_KpnS_Uniso1E, observou-se o ponto mínimo de absorção em torno de 244 nm e um máximo de absorção a 256 nm, valores que estão dentro do padrão para soluções contendo bacteriófagos, variando conforme a pureza da solução analisada. De acordo com a varredura espectral apresentada na Figura 4, a suspensão fágica apresentou grande quantidade de partículas víricas e poucos contaminantes como debris celulares e proteínas plasmáticas bacterianas (RIOS et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019a).

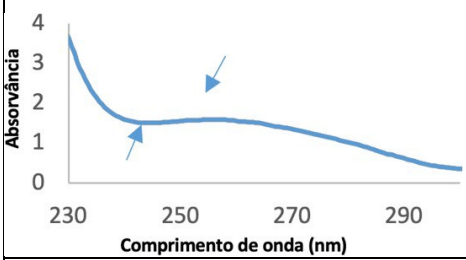

Figura 4. Varredura espectral na zona UV-Vis.

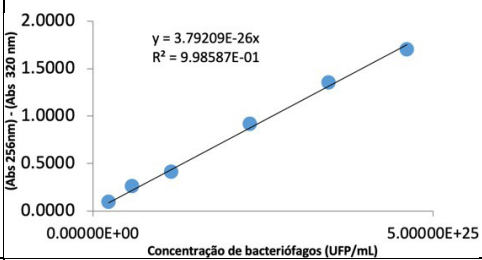

Figura 5. Relação linear entre absorvância corrigida e concentração de partículas fágicas.

A curva de calibração corresponde à relação linear entre os valores de absorbância corrigida e a concentração de partículas bacteriofágicas. Com os resultados obtidos na varredura

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759

UV-Vis, a curva de calibração produzida com as absorvâncias a 256 nm (ponto máximo observado) corrigidas para 320 nm, permitiu determinar o coeficiente de extinção molar através da equação de Beer-Lambert, o qual foi de □vB_KpnS_Uniso1E = $3.792x10^{-26}$ $(PFU/mL)^{-1}•cm^{-1}$ (Figura 5). A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) permitiu a determinação do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas e respetivos pesos moleculares, variando de 34 a 169 kDa. O electroforetograma corado com Coomassie exibido na Figura 6 permitiu produzir uma curva de calibração para as proteínas na lane de marcadores de peso molecular (lane M), resultando na equação linear Log(MW, kDa) = - 3,1104x³ + 5,9025x² - 4,2848x (r= 0.9968) (Figura 7).

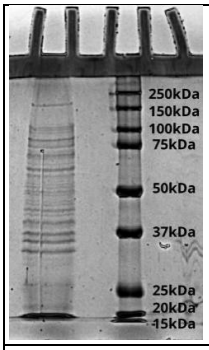

Figura 6. Electroforetograma do fago vB_KpnS_Uniso1E.

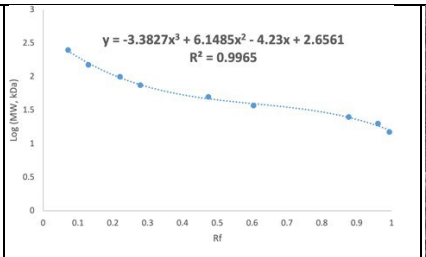

Figura 7. Curva de calibração das proteínas.

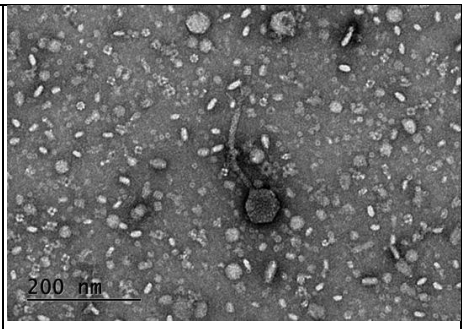

Figura 8. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do bacteriófago vB_KpnS_Uniso1E.

Em relação à microscopia eletrônica de transmissão, a suspensão de fagos colocada nas grades de cobre foi analisada minuciosamente, podendo-se concluir que as partículas bacteriofágicas isoladas pertencem à ordem Caudovirales, ou seja, possuem DNA de fita dupla como material genético, e pertencem muito provavelmente à família *Siphoviridae,* mas para confirmação mais definida deve ser realizado o sequenciamento do seu genoma.

4 CONCLUSÃO

O bacteriófago denominado vB_KpnS_Uniso1E, isolado a partir de amostra coletada no esgoto do Hospital Veterinário da Universidade de Sorocaba (Sorocaba/SP, Brasil), apresentou um elevado potencial lítico, mesmo quando diluído diversas vezes. Através da caracterização físico-químicas preliminar, foi possível constatar que a suspensão contendo o bacteriófago isolado possui grande quantidade de partículas víricas e poucos contaminantes como debris celulares e proteínas citoplasmáticas, além de uma grande quantidade de proteínas estruturais. Adicionalmente, o fago isolado mostrou pertencer à ordem Caudovirales e muito provavelmente à família *Siphoviridae*, mais ensaios devem ser feitos para melhor identificação das características do fago, como por exemplo caracterização biológica e genômica, com o intuito de desenvolver formulações para a aplicação de terapia fágica através de sistemas de *delivery* com segurança e efetividade comprovadas.

REFERÊNCIAS

ALÓS, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.** Espanha. 2014.

BALCÃO, V.M.; BELLINE, B.G.; SILVA, E.C.; ALMEIDA, P.F.F.B.; BALDO, D.Â.;

AMORIM, L.R.P.; OLIVEIRA, J.M.; VILA, M.M.D.C.; DEL FIOL, F.S. Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli* in uterine infections: *in vitro* and *ex vivo* preliminary studies in veterinary medicine, **Pharmaceutics** v.14, n.11, p. 2344-2386, 2022.

DANTAS, B.H.J; GURJEL, J.A.R. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): os desafios da resistência bacteriana no âmbito hospitalar. **Respositório Universitário da Anina RUNA).** Universidade Potiguar, p. 1-17, 2021.

EL-SHIBINY, A; El-SAHHAR, S. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 865-879, 2017.

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; ROSSI, F. P. N.; CIEZA, B.; OLIVEIRA, T. J.; PEREIRA, C.; TOMAZETTO, G.; SILVA, B. B.; SQUINA, F. M.; VILA, M. M. D. C.; SETUBAL, J. C.; HA, T.; DA SILVA, A. M.; BALCÃO, V. M. Characterization and *in vitro* testing of newly isolated lytic bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*, ***Future Microbiology*** **n.17, v.2, p.** 111-141, 2021.

KARUMIDZE, N.; KUSRADZE L.; RIGVAVA S.; GODERDZISHVILI, M.; RAJAKUMAR, K.; ALAVIDZE Z.. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of K*lebsiella pneumoniae* and K*lebsiella oxytoca.* **Current Microbiology,** v. 66, n. 3, p.251-258, 2013.

LIMA, C.C; BENJAMIM, S.C.C; SANTOS, R.F.S. Mecanismos de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **Cuidarte Enfermagem**, p 105- 113, 2017.

MOXLEY, R. Family *Enterobacteriacea*. In: McVEY, D. S.; KENNEDY, M. CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. 3 ed. Nova Jersey: Wiley Blackwell, cap. 6, p.53-61, 2013.

NECA, C.S.M.; MARQUES, A.A.; OLIVEIRA JUNIOR, C.L.; SILVA, M.E.S.; COSTA, RIOS, A. C.; VILA, M. M. D. C.; LIMA, R.; DEL FIOL, F. S.; TUBINO, M.; TEIXEIRA, J. A.; BALCÃO, V. M. Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for the inhalational treatment of bacterial pneumonia, **Process Biochemistry** v.64, p 177-192, 2018.

SILVA, E. C.; OLIVEIRA, T. J.; MORELI, F. C.; HARADA, L. K.; VILA, M. M. D. C.; BALCÃO, V. M. Newly isolated lytic bacteriophages for Staphylococcus intermedius, structurally and functionally stabilized in a hydroxyethylcellulose gel containing choline geranate: potential for transdermal permeation in veterinary phage therapy**, Research in Veterinary Science,** v.135, p.42-58, 2020.

SIEBERT, G; HÖRNER R.; MENEGHETTI, B.H.; RIGHI, R.A.; DAL FORNO, N.L.; SALLA, A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein,** v.12, n 3, p. 282-286, 2014.

DOI: 10.51161/iii-conamic/13759