

Universidade de Brasília -UnB
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Caracterização de *Serratia marcescens* pan-resistentes causadoras de bacteremia por abordagens fenotípicas, genéticas e genômicas.

Discente: Leticia Olivier Sudbrack

Orientadora: Tatiana Amabile de Campos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana como requisito para a obtenção de título de Mestre em Biologia Microbiana.

Brasília, DF. Dezembro de 2023.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à Ciência e à Saúde Pública do Distrito Federal, como parte de minha contribuição para um mundo com menos obscurantismo científico e mais verdades baseadas em princípios e evidências científicas.

Dedico a todos os pacientes que sofrem ou já sofreram por infecções relacionadas às bactérias multirresistentes. Desejo que a vontade de curar o sofrimento dos que passam por tratamentos antimicrobianos prolongados e cheios de efeitos adversos seja motivo para que estudemos cada vez mais esse tema tão desafiador.

Dedico aos meus pais, Maria Fátima Olivier Sudbrack e Fredy Sudbrack (in memoriam) que sempre foram meus modelos de profissionais, cientistas e sempre me apoiaram e deram suporte incondicional às minhas decisões acadêmicas.

Dedico em especial ao Prof Dr. Alexandre Prehn Zavascki, por ter me feito prometer que não abandonaria minha carreira acadêmica ao me mudar de Porto Alegre, e por sempre ser, mesmo que de longe, um grande modelo de médico e pesquisador.

Agradecimentos

“...Sonho que se sonha junto é realidade...”

Raul Seixas

A finalização desse trabalho não teria sido possível sem o auxílio e apoio de inúmeros amigos e profissionais que não mediram esforços para me ajudar na realização desse projeto. Agradeço incondicionalmente a todos que me auxiliaram na realização desse trabalho, que também foi a realização de um sonho em minha carreira acadêmica.

Agradeço o **Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília** e a todos os docentes que viabilizaram e fizeram parte do meu aprofundamento técnico e teórico neste período. Agradeço em especial à **Prof. Tatiana Amabile de Campos** pelo incansável e impecável trabalho como orientadora. Você foi a chave mestra para a realização de todo esse projeto. Com toda sua capacidade técnica e humana me auxiliou na realização desse sonho em um momento tão especial da minha vida, sendo acima de tudo compreensiva, parceira, amiga e prestativa. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos e orientações, desejando sempre que seja o primeiro de muitos que ainda virão.

Agradeço ao **Dr Luis Janssen Maia** por todos os ensinamentos de genômica compartilhados e pela dedicação, parceria e realização do sequenciamento e análises dos genomas dos isolados apresentados neste trabalho. E, em especial aos **Profs. Bergman Moraes Ribeiro e Ana Flávia Alves Parente** e ao **Dr Fernando Melo (OneSite Genomics)** pela parceria e por viabilizarem o sequenciamento genômico através de seus laboratórios de pesquisa.

Agradeço também ao **Prof. André Pitondo (Unaerp-SP)**, e **Dr Rafael Nakamura** pelos ensinamentos e pelo auxílio técnico na realização dos ensaios genotípicos e fenotípicos apresentados nesse trabalho, bem como às colegas **Laura Fernandes e Ana Paula Cardoso** pelo auxílio nas técnicas de extração de DNA das amostras deste estudo.

Agradeço enormemente aos amigos e equipe do Hospital de Base do Distrito Federal - IGESDF, em especial ao **Dr Julival Fagundes Ribeiro, Dr Tazio Vanni, Dr Ricardo Guzman** e a todos da **DIEP (Diretoria de Inovação, Ensino e Pesquisa)** que tanto contribuíram nas análises e nas publicações relacionadas a este trabalho e que foram acima de tudo grandes incentivadores desse projeto pessoal e profissional.

Deixo por último, mas não por menor importância, o agradecimento à minha família, em especial ao meu amado marido, **Paulo Sergio**, minha mãe, **Maria Fátima**, meu pai, **Fredy (in memoriam)** e meus irmãos, **Larissa** e **Luis Alfredo**, pelo amor, incentivo, paciência e compreensão que vocês sempre tiveram comigo. Vocês são a base da minha vida e motivo de todo o meu esforço em tentar ser uma pessoa sempre melhor.

Lista de abreviaturas:

OMS: Organização Mundial de Saúde

RAM: Resistência bacteriana aos antimicrobianos

BRAM: Bactérias resistentes aos antimicrobianos

MR: Microrganismos resistentes

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

BGN: Bactérias Gram negativas

MDR: Multirresistência

XDR: Resistência extensiva

PDR: Pan resistência

IPCS: infecções primárias de corrente sanguínea

CARB-R: não susceptibilidade aos carbapenemicos

WSG: Sequenciamento gnômico completo

Lista de figuras

- Figura 1** - Mecanismos de RAM na célula bacteriana..... **Pág. 17**
- Figura 2** - Classificação das β -lactamases segundo Ambler. Traduzido e adaptado de Noster; Thelen, Hamprecht, 2021 (14)**Pág. 19**
- Figura 3** – Testes imunocromatográficos exibindo resultados. A) resultado negativo para presença de carbapenemases, apenas linha do controle teve reação. B) resultado positivo para presença de carbapenemase tipo VIM, teste válido pois também houve reação na linha do controle. C) e D) Testes não válidos pois não houve positividade da linha do controle **Pág. 23**
- Figura 4** – Antibiograma para a determinação de susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco difusão. Setas brancas indicando o halo de inibição ao redor do disco de fosfomicina para os quatro isolados. Setas vermelhas mostrando o halo de inibição ao redor do disco de aztreonam nos isolados 2 e 4..... **Pág. 44**
- Figura 5** – Antibiograma por disco difusão para a detecção de carbapenemases do tipo metalo- β -lactamases. Em cada placa os discos da esquerda foram impregnados com imipenem (carbapenêmico) e os discos da direita foram impregnados com imipenem e EDTA. Resultados de teste fenotípico pela técnica EDTA, as setas apontando o halo de inibição ao redor do disco impregnado por EDTA confirmando a presença de metalo- β -lactamases em todas os isolados..... **Pág. 46**
- Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) contendo o produto da amplificação dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* através da técnica de PCR. A) Setas brancas indicando as linhas de amplificação do gene *bla_{KPC}* nos isolados 1 e 3 e no controle positivo. B) Setas vermelhas indicando as linhas de amplificação do gene *bla_{NDM}* em todos os isolados e no controle positivo..... **Pág. 48**
- Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose (1%) contendo o produto da amplificação de sequencias ERIC por meio de PCR. O perfil eletroforético apresentou-se idêntico para todos os isolados demonstrando 100%de similaridade genética para esta técnica.....**Pág. 49**
- Figura 8** - Fluxograma das etapas metodológicas e momentos de congelamento das amostras que pode justificar a instabilidade do gene *bla_{KPC}* e divergência entre resultados fenotípicos, genotípicos e genômicos.....**Pág. 60**
- Figura 9** – Árvore filogenética após análise do genoma dos isolados 1, 3 e 4..... **Pág. 62**
- Figura 10** – Árvore filogenética gerada por meio da análise de pangenoma de *Serratia marcescens* demonstrando a similaridade de origem de outros isolados já analisados ao redor do mundo.....**Pág. 63**

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados dos isolados clínicos de <i>Serratia Marcescens</i>	Pág. 36
Tabela 2 - Primers utilizados para realização do PCR para detecção de genes de resistência.....	Pág. 39
Tabela 3 - Perfil de não susceptibilidade a antimicrobianos determinado por testes de sensibilidade por disco difusão realizados para os quatro isolados utilizando critérios CLSI 2022.....	Pág. 45
Tabela 4 – Perfil de não susceptibilidade antimicrobiana determinada pelo meio de análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 1.....	Pág. 51
Tabela 5 – Perfil de não susceptibilidade antimicrobiana determinada por meio de análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 2.....	Pág. 52
Tabela 6 – Perfil de não susceptibilidade antimicrobiana determinada por meio de análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 3.....	Pág. 53
Tabela 7 – Determinação do perfil de não susceptibilidade antimicrobiana por meio da análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 4.....	Pág. 54
Tabela 8 - Genes preditores de resistência bacteriana detectados por genômica nos isolados 01, 02, 03 e 04.....	Pág. 56
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas fenotípicas, genotípicas e genômicas.....	Pág. 58

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) occurs when bacteria do not respond to offered therapies, making infections more difficult to treat and potentially leading to the patient's death. Serratia marcescens is an enterobacteria responsible for causing healthcare-associated infections (HAIs) and frequently present AMR. This species is considered a causative agent of treatment-challenging opportunistic infections due to the presence of several types of AMR-promoting mechanisms. In this context, it is essential to expand the study of AMR dissemination mechanisms with a view to rapid and accurate diagnosis, in addition to epidemiological tracking to interrupt the chain of AMR transmission within the environment. In the present work, four (4) isolates of Serratia marcescens causing bacteremia in patients admitted to an Intensive Care Unit (ICU) were subjected to determination of the antimicrobial susceptibility profile and molecular epidemiology. The determination of the antimicrobial susceptibility profile was determined by phenotypic tests (antibiogram using automated methods, disk diffusion and immunochromatography), genotypic tests for the detection of beta-lactamases (PCR) and genomic tests (WGS sequencing). The delineation of the transmission chain of the isolates was determined by molecular epidemiology through fingerprinting analysis of intergenic repetitive sequences for enterobacteria (ERIC-PCR) and by pangenome. Phenotypic and genomic analyzes for non-susceptibility demonstrated that all isolates were resistant to all available antimicrobials and were classified as pan-resistant (PDR). Immunochromatography identified the carbapenemases KPC and NDM in all isolates, however PCR genotyping identified KPC in only 2 isolates and genomics did not identify the enzyme in any of them. Genetic similarity analysis by ERIC-PCR and pangenomics determined that the isolates were phylogenetically identical and, therefore, clonal. In total, the results indicate that genomic analyzes by WGS are accurate and robust tools for diagnosing AMR, however it must be performed immediately after bacterial isolation to avoid inaccurate diagnoses due to loss of unstable genetic elements, as in the case of bla_{KPC} which encodes the KPC enzyme. Pan-genome analysis also proved to be accurate for identifying bacterial clones among isolates, in addition to making it possible to identify the presence of clones that spread worldwide.

Keywords: *Serratia marcescens*, bacteremia, antimicrobial resistance, molecular epidemiology, outbreak.

RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) acontece quando bactérias não respondem às quimioterapias ofertadas tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas podendo levar à morte do paciente. *Serratia marcescens* é uma enterobactéria responsável por causar infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e, frequentemente, apresentam RAM. Esta espécie é considerada um agente causador de infecções oportunistas de tratamentos desafiadores devido à presença de vários tipos de mecanismos promotores de RAM. Neste contexto, é fundamental que se amplie o estudo dos mecanismos de disseminação de RAM visando o diagnóstico rápido e preciso, além do rastreamento epidemiológico para interromper a cadeia de transmissão de RAM dentro do ambiente. No presente trabalho, quatro (4) isolados de *Serratia marcescens* causadores de bacteremia em pacientes internos em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) foram submetidos à determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e de epidemiologia molecular. A determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi determinada por testes fenotípicos (antibiograma por métodos automatizados, disco difusão e imunocromatografia), genotípico para a detecção de beta-lactamases (PCR) e por genômica (sequenciamento WGS). O delineamento da cadeia de transmissão dos isolados foi determinado por epidemiologia molecular através da análise de *fingerprinting* de sequências repetitivas intergênicas para enterobactérias (ERIC-PCR) e por pangenoma. As análises fenotípicas e de genômica para não susceptibilidade demonstram que todos os isolados se apresentaram resistentes a todos antimicrobianos disponíveis sendo classificados como pan-resistentes (PDR). A imunocromatografia identificou as carbapenemases KPC e NDM em todos os isolados, contudo a genotipagem por PCR identificou KPC apenas em 2 isolados e a genômica não identificou a enzima em nenhum deles. As análises de similaridade genética por ERIC-PCR e pangenômica determinou que os isolados se apresentaram filogeneticamente idênticos e, portanto, clonais. Em sua totalidade os resultados indicam que análises genômicas por WGS são ferramentas precisas e robustas para o diagnóstico de RAM, contudo a mesma deve ser realizada imediatamente após o isolamento bacteriano para evitar diagnósticos imprecisos devido à instabilidade dos genes associados aos plasmídeos em que os genes estão

inseridos, como no caso de *bla_{KPC}* que codifica a enzima KPC. A análise de pan-genoma, também, demonstrou-se precisa para a identificação de clones bacterianos entre os isolados, além de possibilitar identificar a presença de clones de disseminação mundial.

Palavras-chave: *Serratia marcescens*, bacteremia, resistência antimicrobiana, epidemiologia molecular, surto.

Sumário

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
<i>Serratia marcescens</i>	15
Mecanismos promotores de RAM em BGNs e <i>S. marcescens</i>	15
Métodos de identificação e diagnóstico de RAM	21
Métodos de determinação de clonalidade bacteriana e sua aplicação na vigilância de infecções causadas por RAM	29
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS.....	35
Objetivo geral.....	35
Objetivos específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
Isolados bacterianos	36
Testes de susceptibilidade antimicrobiana.....	37
Realização de testes fenotípicos para detecção de carbapenemases.....	38
Extração de DNA genômico	38
Detecção de genes promotores de resistência antimicrobiana por PCR.....	38
Determinação da similaridade genética por ERIC- PCR	39
Sequenciamento de genomas.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
Determinação fenotípica da susceptibilidade antimicrobiana	43
Determinação molecular da resistência antimicrobiana	47
Determinação do perfil de similaridade genética por ERIC-PCR.....	48
Análise genômica dos isolados e determinação da susceptibilidade antimicrobiana por sequenciamento <i>WGS</i>	50
Análise comparativa da genômica dos isolados	55
Determinação da similaridade genética dos isolados por análise de pangenoma.....	61
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

O conceito “*One Health*” ou “Saúde única” foi consolidado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a partir do entendimento de que a saúde humana, animal e o meio ambiente estão intimamente ligados e são indissociáveis. A OMS o descreve como parte de uma iniciativa mundial, integrada e multidisciplinar de ações para otimizar a saúde das pessoas, dos animais e do meio ambiente. Em um mundo globalizado onde as fronteiras para agravos de saúde são muito difíceis de serem estabelecidas, esses esforços são internacionalmente relevantes para responder à desafios de saúde global como a COVID-19, a resistência bacteriana aos antibióticos e outros problemas de saúde pública que facilmente ultrapassam as barreiras geográficas dos países (1-2). A indissociabilidade da saúde humana, animal e ambiental preconizada pela “Saúde Única” estabelece que os componentes desta tríade estão associados à disseminação de patógenos. Neste sentido, o referido conceito aplica-se intimamente ao contexto da resistência bacteriana aos antimicrobianos (RAM) por buscar medidas que a serem adotadas globalmente para que se combata a disseminação dos microrganismos resistentes (MR) (1).

A RAM acontece quando bactérias não respondem aos tratamentos antimicrobianos ofertados tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas, aumentando o tempo de internação, intensificando a gravidade das doenças e, muitas vezes levando o paciente à morte. É atualmente um dos principais problemas de saúde pública do mundo (1-2). O efeito da RAM na saúde pública global originou o Plano de Ação da OMS contra a resistência antimicrobiana (*One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance*) pela Comissão Europeia em 2015 para auxiliar nas medidas de mitigação do aumento da RAM (3).

Mundialmente, o aumento da RAM ocorre dentre outras causas, pelo uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos por profissionais de saúde. Segundo o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), mais de 50% dos antibióticos nos Estados Unidos são prescritos de forma inadequada ou desnecessária (2). O uso indiscriminado de antimicrobianos é um fator de risco conhecido para a disseminação de bactérias

multirresistentes em ambiente hospitalar. Por esse motivo, é necessário controlar o uso de antimicrobianos no âmbito hospitalar, urbano, no meio ambiente e na indústria (2).

Várias espécies bacterianas são responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Dentro deste contexto, as bactérias bacilos Gram negativos (BGN) são considerados protagonistas na disseminação de multirresistência (MDR) (4). Os primeiros relatos de BGNs MDR datam de 1990 (4). A partir disto, as BGNs vêm continuamente sendo associadas à disseminação de RAM, não somente à MDR (resistência a três classes de antimicrobianos), mas também a resistência extensiva (XDR) (susceptibilidade à apenas uma classe de antimicrobiano) e à Pan resistência (PDR) (não susceptibilidade a nenhum antimicrobiano disponível) (4-5). Mundialmente, este cenário coloca as BGNs entre os microrganismos de interesse para desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (3,6,7).

Entre as BGNs aquelas pertencentes à ordem Enterobacterales estão entre os principais patógenos veiculadores de MDR/XDR/PDR (4). Este grupo bacteriano compreende BGNs anaeróbios facultativos que causam um grande espectro de infecções severas tais como sepse, infecções hospitalares, infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais (8). Neste contexto, uma espécie das Enterobacterales, a *Serratia marcescens*, atua como um agente oportunista causando infecções principalmente em pacientes com uso prévio de antimicrobianos ou com a imunidade debilitada, sendo comumente associada às IRAS. Esta bactéria pode causar várias síndromes infecciosas, dentre elas pneumonia, meningite, sepse, peritonite, endocardite, artrites, osteomielites, infecções do trato urinário, de pele e partes moles (9).

O tratamento das infecções causadas por *S. marcescens* é desafiador devido à presença de vários mecanismos intrínsecos de resistência a diversos antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, macrolídeos e polimixinas. Usualmente, os tratamentos de infecções graves por essa bactéria se baseiam no uso de cefalosporinas de quarta geração (cefepime), carbapenêmicos (meropenem) ou aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina) (10). Com o surgimento de resistências também à essas classes de antimicrobianos, a *S. marcescens* já faz parte dos

patógenos definidos pela OMS como prioritários para desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (9,11).

Pelas razões acima expostas, a detecção precisa do perfil de não susceptibilidade antimicrobiana em isolados clínicos de *S. marcescens* é essencial para o estabelecimento de prática terapêutica segura e eficaz. Além de garantir o controle do processo infeccioso, o tratamento correto contribui para interromper a cadeia de disseminação de RAM. Neste cenário, métodos de diagnóstico acurados se fazem necessários para a terapia e para o controle da disseminação de RAM âmbito hospitalar. No presente trabalho, determinamos o perfil clonal e de não susceptibilidade de quatro isolados de *S. marcescens* de uma unidade de terapia intensiva (UTI) por diferentes abordagens: fenotípica, molecular e genômica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Serratia marcescens

A *Serratia marcescens* é um bacilo Gram negativo, móvel e de fermentação lenta de lactose, da ordem das Enterobacterales, caracterizada pela sua plasticidade genética e metabólica, o que permite a sua adaptação em diversos nichos, incluindo o solo, água, plantas e ambientes hospitalares (10).

Essa espécie tem ganhado atenção por ser um patógeno com perfil de resistência aos antimicrobianos frequentemente relatado como multirresistente e que pode provocar infecções em paciente imunocomprometidos e surtos hospitalares, o que geralmente ocorre em ambientes de terapia intensiva ou unidades de neonatologia. Os níveis de resistência aos antibióticos na espécie são consequências da resistência intrínseca, adquirida e adaptativa que elas podem sofrer (10,12).

Mecanismos promotores de RAM em BGNs e *S. marcescens*

A RAM no geral pode ser (i) intrínseca, quando os genes associados a eles são cromossômicos da espécie; (ii) adquirida, quando o gene de resistência vem transferido horizontalmente através de plasmídeos ou de mutações ao acaso; (iii) ou adaptativa, quando há rápido ajuste do transcriptoma em resposta a condições de estresse ou estímulos ambientais (9)(10). Ao contrário da resistência intrínseca ou adquirida, a resistência adaptativa é um fenótipo não hereditário que geralmente se reverte após a remoção do estímulo que a desencadeou (10).

Os genes promotores de RAM estão naturalmente presentes nas espécies bacterianas fazendo parte de suas estratégias competitivas para sobrevivência mesmo em período anteriores do uso de antimicrobianos como fármacos terapêuticos. O uso de antimicrobianos nos diferentes âmbitos antropogênicos (rotinas clínicas, hospitalares, industrial e produção de alimentos) atua como pressão seletiva por eliminarem as linhagens suscetíveis e elevarem a prevalência de linhagens bacterianas

resistentes. O estudo destes genes de resistência aos antimicrobianos é essencial para a melhor compreensão sobre as respostas aos tratamentos antimicrobianos e sobre o processo evolutivo das espécies bacterianas (10).

Existem vários mecanismos para uma BGN apresentar resistência aos antimicrobianos. As bombas de efluxo, a produção de enzimas, a alteração da permeabilidade da parede celular e a alteração da afinidade do sítio de ligação são exemplos das principais formas de expressar a resistência aos antimicrobianos e estão ilustrados na figura 1. Esses mecanismos usualmente são aditivos podendo ser encontrados concomitantemente nas bactérias com resistência a múltiplas drogas. Os genes que expressam esses mecanismos de resistência podem ser codificados pelo cromossomo bacteriano sendo intrínsecos da espécie bacteriana, como já citado anteriormente, ou serem genes plasmidiais, que são geralmente os genes adquiridos e podem estar presentes apenas em algumas linhagens bacterianas, não sendo característica intrínseca da espécie (10).

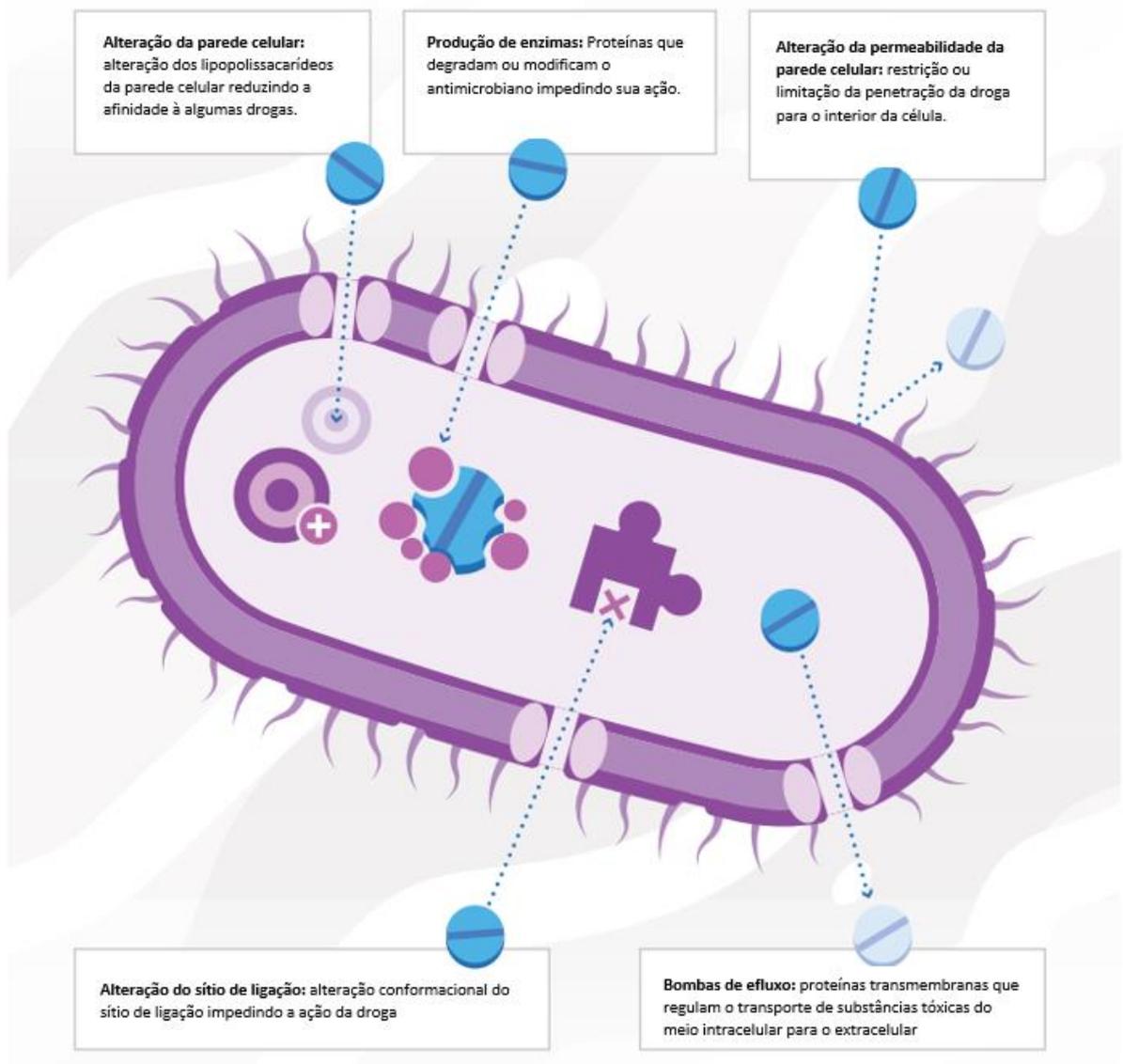


Figura 2 - Mecanismos de RAM na célula bacteriana. Traduzido e Adaptado de CDC (13).

Dentre os genes intrínsecos de resistência aos antimicrobianos de *Serratia*, podemos citar algumas bombas de efluxo, que são proteínas transmembranas que regulam o transporte de substâncias tóxicas do meio intracelular para o extracelular. É um mecanismo que transfere para o ambiente externo da célula vários componentes como ácidos graxos, sais biliares, corantes e antibióticos. Uma análise genômica revelou mais de 70 genes diferentes associados ao efluxo, amplamente distribuídos entre isolados nosocomiais e ambientais de *Serratia* (10,14). Este é o principal mecanismo responsável pelas principais resistências intrínsecas em *Serratia*, porém genes de resistência adquiridos também podem ainda modificar as bombas de efluxo causando resistência adquirida (9).

Outro mecanismo de RAM intrínseco encontrado em *Serratia* é a modificação dos lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular por adição de cargas positivamente carregadas conferindo redução da afinidade às polimixinas de forma natural e fazendo com que essa espécie seja intrinsecamente resistente aos peptídeos catiônicos (9).

Um terceiro exemplo de mecanismo de resistência cromossômico ou intrínseco é a produção de enzimas, dentre elas as β -lactamases, que são capazes de hidrolisar alguns β -lactâmicos. A produção dessas enzimas pode ser codificada cromossomicamente como o exemplo da β -lactamase, cefalosporinase de classe C, a AmpC, que por sua vez é responsável pela hidrólise induzível de todas as penicilinas e cefalosporinas de terceira geração. Essa enzima também pode ser codificada por genes plasmidiais (10).

Essas enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, as β -lactamases, atuam através da inativação dos β -lactâmicos. A produção de enzimas β -lactamases é um dos principais mecanismos de resistência de *Serratia* e das BGNs em geral. Tais enzimas são categorizadas em quatro classes de acordo com a sua estrutura primária e dentro de dois grupos com base no seu mecanismo catalítico. São divididas inicialmente nos grupos serina- β -lactamases (que contém as Classes A C e D) e no grupo das metalo- β -lactamases (que contém a Classe B) tendo seus principais exemplos descritos na figura 2. Dentre as Serina- β -lactamases, a da classe C (AmpC) é codificada cromossomicamente em *Serratia* e é invariavelmente distribuída entre todos os isolados desta espécie bacteriana. Sua atividade está ligada a resistência à todas as penicilinas bem como às cefalosporinas de terceira geração. A expressão do gene cromossomal da AmpC é induzida por alguns beta lactâmicos através do acúmulo de catabólitos de peptideoglicanos no citosol (9). O *cluster* regulatório *ampC* (*ampD*, *ampE*, *ampR* e *ampG*) é encontrado entre isolados de *S. marcescens*, entretanto, as mutações que conferem expressão da *ampC* são estimadas em acontecerem *in vitro* em taxas de até 60 vezes menos do que em espécies de *Citrobacter* e *Enterobacter* (9).

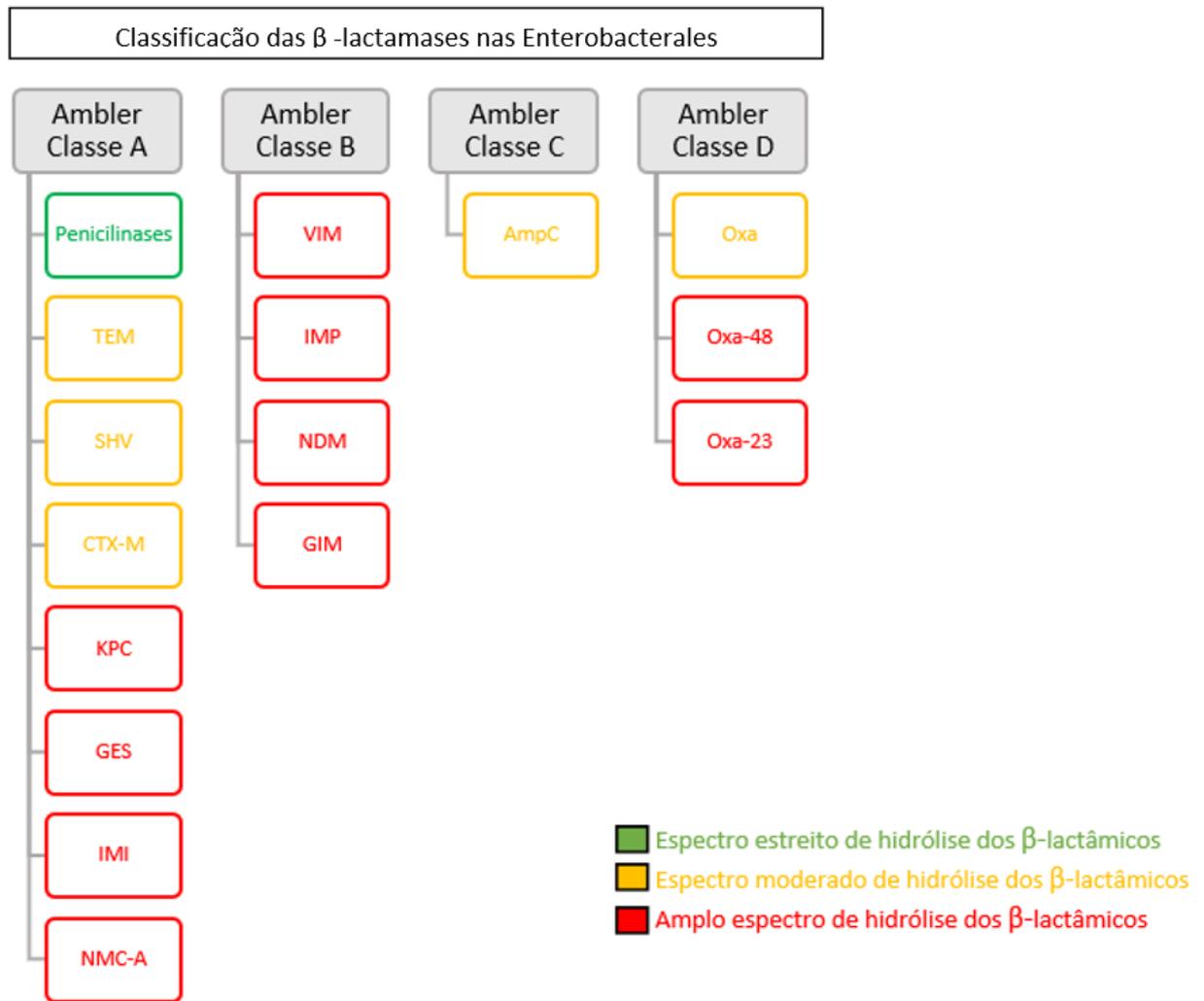


Figura 2 - Classificação das β -lactamases segundo Ambler. Traduzido e adaptado de NOSTER; THELEN, HAMPRECHT, 2021 (15).

As enzimas β -lactamases também podem ser classificadas seguindo seu espectro de ação dentre os β -lactâmicos. O espectro de ação mais amplo é o das carbapenemases, que são capazes de hidrolisar todos os representantes das classes dos β -lactâmicos incluindo os carbapenêmicos. A produção dessa enzima, geralmente codificada por genes plasmidiais, adquiridos, nas espécies de *Serratia* torna os tratamentos de infecções relacionadas às bactérias que as produzem ainda mais complexos. As carbapenemases podem pertencer às classes A, B e D conforme figura 2. As carbapenemases da classe A, são conhecidas como Serina-carbapenemases e possuem como principal exemplo a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase por ter sido isolada primeiramente nesta espécie de bactéria).

As carbapenemases da classe B são as metalo- β -lactamases (M β L) e diferentemente das Serina- β -lactamases utilizam íons divalentes, comumente zinco, como cofator para sua atividade catalítica. O principal exemplo das M β L é a NDM (New Deli carbapenemase). As bactérias que expressam M β L diferentemente das Serina- β -lactamases não são afetadas pelos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, nem mesmo aos mais recentes como Avibactam ou Vaborbactam. Entretanto, os β -lactâmicos do grupo dos monobactâmicos, como Aztreonam por exemplo, apresentam boa estabilidade hidrolítica e não são inativados pelas M β L. O grande problema que impede essa droga como possibilidade terapêutica é que a maior parte das bactérias que expressam M β L também expressam outros mecanismos de resistência como a produção de outras classes de β -lactamases concomitantemente, que por sua vez neutralizam o Aztreonam de modo que essa droga só poderá ser usada nesse cenário na ausência desses outros mecanismos ou na presença de inibidores dessas outras β -lactamases (15,16).

As β -lactamases carbapenemases de classe D têm estrutura baseada no sítio ativo dependente de serina e podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano. São tradicionalmente conhecidas como Oxacilinas (OXA), pois as primeiras descritas chamavam a atenção pela sua capacidade de hidrolisar a oxacilina. Elas assim como as M β L não são inibidas pelos inibidores da β -lactamases tradicionais mesmo não possuindo íons metálicos à sua estrutura. O principal exemplo de carbapenemase da Classe D são as OXA (*OXA-type Carbapenemases*) e as mais isoladas são OXA-23 e OXA-58, produzidas, normalmente, por *A. baumannii* e OXA-48, produzidas por *Klebsiella pneumoniae*. Os genes que codificam a produção dessas enzimas podem ser plasmidiais e transferíveis para outras espécies bacterianas (15).

A aquisição dos genes das M β L com a consequente produção das enzimas dessa classe, é o mecanismo de resistência aos antimicrobianos atualmente que mais merece atenção devido à sua capacidade de hidrolisar quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos (classe mais utilizada clinicamente sendo composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) poupando apenas os monobactâmicos, e por ser resistente aos inibidores dessas enzimas disponíveis

comercialmente (17,18). A perda completa de possibilidade de tratamento por essa classe de antimicrobianos devido a presença das enzimas metalo- β -lactamases, torna necessária a utilização de outras classes terapêuticas que são menos seguras e eficazes como por exemplo os aminoglicosídeos, as tetraciclinas ou as quinolonas que são muito mais tóxicas para o indivíduo, tem mais efeitos adversos, menor poder microbicida e, conseqüentemente, menores chances de sucesso terapêutico. Além disso, geralmente a aquisição de genes de resistência plasmidiais que codificam a produção de β -lactamases usualmente vêm acompanhados da aquisição de outras formas de resistência também à outras classes de antimicrobianos, dificultando ainda mais o tratamento e possibilitando uma chance ainda menor de sucesso terapêutico (15,16).

Outro gene de resistência que pode ser adquirido para produção de enzimas que inativam os antimicrobianos por *Serratia*, são os genes que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Nesses casos, a resistência à classe dos aminoglicosídeos muitas vezes surge após modificações químicas nas estruturas desses antimicrobianos causadas pela atividade destas enzimas (9).

No contexto em que se prima pelo maior conhecimento e redução da disseminação de microrganismos multirresistentes, busca-se entender cada vez mais sobre os genes de RAM e identificá-los sempre que possível para auxílio na escolha dos tratamentos antimicrobianos. Para isso é fundamental que se amplie o estudo dos genes de resistência dos isolados encontradas na prática clínica e no ambiente.

Métodos de identificação e diagnóstico de RAM

Atualmente existem várias formas de identificação e detecção de RAM. Uma delas é a análise fenotípica, realizada por meio de métodos bioquímicos convencionais que podem ser automatizadas ou manuais. Dentre os métodos manuais podemos citar o método de difusão em disco, as fitas de gradiente (*E-test*) e determinação da concentração inibitória mínima por meio de diluição em série (19,10). As plataformas VITEK (bioMérieux); BDPhoenix (BD), SensititreTM (ThermoFisher) e Micro-Scan WalkAway (Beckman Coulter) realizam análises automatizadas em larga escala por meio

de métodos bioquímicos para a detecção de resistência fenotípica aos antimicrobianos. (19).

Entre os determinantes de RAM, a detecção das enzimas β -lactamases tipo carbapenemases é de extrema relevância clínica, uma vez que contribui para o manejo adequado do paciente visto que alguns inibidores de carbapenemases não tem ação sobre as metalo- β -lactamases como citado anteriormente, mas conseguem degradar as serina- β -lactamases por exemplo. Para a detecção destas enzimas podem ser utilizados testes de triagem e testes confirmatórios para detectar e diferenciar a presença e produção dessas enzimas (19).

Para se avaliar fenotipicamente a presença de enzimas β -lactamases carbapenemases existem alguns testes como os imunocromatográficos e os testes de EDTA. Os testes imunocromatográficos, como o NG-Test® CARBA 5, são testes visuais e rápidos para detecção qualitativa de uma ou mais carbapenemases, fazendo a diferenciação das cinco carbapenemases mais comuns (KPC, tipo OXA-48, VIM, IMP e NDM). O *kit* é composto pelo tampão de extração líquido, que é usado como uma solução de lise celular quando misturado com as colônias. Os anticorpos monoclonais que individualmente reconhecem cada uma das cinco carbapenemases são imobilizados numa membrana de nitrocelulose. Os anticorpos monoclonais livres estão presentes na placa conjugada e etiquetados com ouro coloidal. Após a adição das colônias misturadas com o tampão de extração à placa da amostra, a ação capilar da nitrocelulose extrai a amostra através de anticorpos móveis e anticorpos imóveis da faixa de teste. Os anticorpos de controle imobilizado capturam quaisquer anticorpos móveis que passam rapidamente na placa de amostra e na nitrocelulose sem vincularem as outras linhas de teste. Um resultado positivo ocorre quando aparece uma linha vermelha na região de controle (C) e uma ou mais linhas aparecem nas regiões de teste (K, O, V, I ou N) e indicam que a amostra contém uma ou mais carbapenemases conforme ilustrado na figura 3. Um resultado negativo ocorre apenas quando é observada a linha de controle e indica que a amostra não contém nenhuma das 5 carbapenemases pesquisadas. Se a linha de controle não aparecer, o resultado do teste é inválido (20).

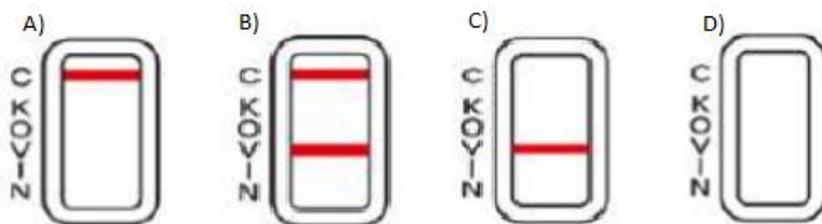


Figura 3 – Testes imunocromatográficos exibindo resultados. A) Resultado negativo para presença de carbapenemases, apenas linha do controle teve reação. B) Resultado positivo para presença de carbapenemase tipo VIM, teste válido pois também houve reação na linha do controle. C) e D) Testes não válidos pois não houve positividade da linha do controle

Um outro tipo de teste fenotípico para detecção da presença da expressão das carbapenemases tipo metalo- β -lactamases são os testes com a presença do EDTA, um quelante de metal que inativa o zinco presente nessas enzimas. Nesses testes, são aplicados lado a lado dois discos na placa em que foi semeada o inóculo bacteriano em análise. O primeiro disco é impregnado por imipenem (um carbapenêmico) puro e o segundo com EDTA. A inativação das metalo- β -lactamases pelo quelante EDTA permite a inibição do crescimento de bactérias que contenham metalo- β -lactamases formando um halo de inibição de crescimento ao redor do disco contendo EDTA, o que não ocorrerá ao redor do disco contendo apenas o imipenem uma vez que as enzimas carbapenemases vão hidrolisar esse antimicrobiano e não haverá inibição do crescimento bacteriano por esta droga, identificando assim a expressão fenotípica de metalo- β -lactamases nesse isolado (19). Esses testes fenotípicos são muito úteis na prática clínica para detecção da presença e do tipo de carbapenemase uma vez que os diferentes tipos dessas enzimas implicam diretamente nas escolhas dos antimicrobianos que serão utilizados para tratamento das infecções causadas por essas bactérias (21,22).

Uma outra forma de detecção de RAM é por meio dos testes moleculares, que diferentemente dos fenotípicos não vão avaliar apenas a expressão gênica e sim a presença do gene em análise no genoma bacteriano. A identificação da presença dos genes de resistência é muito relevante para prática clínica uma vez que as bactérias podem carrear determinados genes que podem não estar sendo expressos no momento da análise. Desta forma, os testes genotípicos, possuem maior sensibilidade quanto à presença dos genes com potencial de conferir resistência aos antimicrobianos.

Um dos exemplos desses testes moleculares para avaliação genotípica da presença dos genes é a genotipagem por amplificação de reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA bacteriano que utiliza *primers* específicos para a amplificação dos genes de interesse associados a expressão de RAM. Essa técnica se baseia na amplificação dos genes de interesse e posterior leitura para identificação da presença destes nos isolados de interesse. As técnicas de PCR são técnicas rápidas, acuradas, reproduzíveis e confiáveis para diagnósticos que são utilizadas para identificar diferentes partes do DNA (23,24).

A identificação de genes e sequências genômicas promotoras de RAM também pode ser determinada por meio DNA *microarray* e do sequenciamento completo de genomas bacterianos (WGS - *Whole Genome Sequencing*). Entre estes métodos, o WGS é o mais utilizado para diagnóstico e estudos de disseminação de RAM (25). A principal vantagem de usar WGS para este propósito é a capacidade deste teste de cobrir diversos alvos ao mesmo tempo, bem como os subtipos específicos e variantes genéticas (genes e mutações) que conferem RAM. Ao contrário dos *microarrays*, o WGS oferece a possibilidade de adicionar rapidamente novas sequências alvos à análise do banco de dados, bem como a capacidade de executar rapidamente uma nova análise em isolados já sequenciados (14,25).

Os métodos de sequenciamento genômico vêm sendo desenvolvidos e aprimorados ao longo dos anos, resultando em sequenciadores cada vez mais sofisticados. Os dados WGS são gerados em plataformas de sequenciamento robustas e altamente sofisticadas, que produzem grandes quantidades de sequências em comparação com a tecnologia tradicional de sequenciamento (primeira geração) (27). A terceira geração, consiste em sequenciadores que pulam a etapa de PCR no preparo prévio da amostra, pois essa etapa está incluída na estratégia de sequenciamento automatizado. As plataformas mais comuns para sequenciamento de genomas bacterianos de alto rendimento utilizadas atualmente são: *Illumina*– PerkinElmer e *Ion Torrent*– ThermoFisher, que realizam o sequenciamento de terceira geração (em oposição ao sequenciamento Sanger – primeira geração e a técnica de shotgun – segunda geração) (28).

Em ambas as plataformas de terceira geração, o resultado consiste em leituras de fragmentos relativamente curtos (100 a 400 pares de bases), o que na maioria dos casos são fragmentos mais curtos do que os genes que conferem resistência aos agentes antimicrobianos. A taxa de ocorrência de erros aleatórios, bem como de erros de sequenciamento são relativamente altos em comparação com erros encontrados com o sequenciamento por Sanger. Para superar este problema, um enorme excedente de fragmentos curtos é produzido para cada genoma e usados para correção de erros. Este excedente de fragmentos (sobrepostos) pode ser mapeado em referências conhecidas (montagem de referência) ou usados para construir fragmentos maiores (montagem *de novo*) de dados de sequência (os chamados *contigs*), que são combinados para constituir o rascunho do genoma do isolado. Outra consideração importante é garantir que os dados WGS não contenham vestígios de DNA contaminante, porque isso pode levar a falsos resultados positivos (25).

O modo como ocorre o sequenciamento de terceira geração com semicondutor, usando IonTorrent, fragmenta inicialmente a amostra de DNA e acopla a adaptadores, os quais são ligados à *beads* e distribuído em *clusters*. Esse método possui alta acurácia, superior aos demais métodos, no entanto o erro ainda é acentuado, sobretudo em sequências de longa repetição de nucleotídeos (29).

Nos métodos de terceira geração de sequenciamento baseados em cores, como por exemplo o Illumina, os fragmentos ligados a adaptadores são distribuídos por chips de leitura onde ocorre a amplificação. A amplificação segue uma dinâmica de formação de “pontes” pela ligação dos adaptadores ao chip, formando assim os “*reads*” ou “sítios de leitura”. Cada dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) adicionado emite uma luminosidade específica, que é utilizada na interpretação e construção da sequência das *reads*. Vale ressaltar que em todos os métodos de terceira geração, deve ser feita a remoção das sequências adaptadoras na montagem das *contigs* por sobreposição das *reads* (31,32).

Atualmente o illumina tem sido o método mais utilizado, devido à sua alta acurácia, e tem possibilitado grandes sequenciamentos com alta precisão. Mesmo assim, não tem desmerecido outros métodos de sequenciamento, a exemplo do Sanger

automatizado – primeira geração, que também é altamente preciso e é utilizado até hoje para pequenos segmentos (32).

Podemos ainda citar a quarta geração de sequenciamento por nanoporos, com os sequenciadores portáteis, como por exemplo o MinION da Oxford Nanopore. A tecnologia do MinION possibilita o sequenciamento de pequenos e longos fragmentos (até 50mil pares de base) a partir da construção de bibliotecas de nucleotídeos. Os fragmentos são passados por proteínas canais em um chip, também chamado de *Flow cell*, por onde a amostra passa. Enquanto os fragmentos atravessam os canais, são emitidas variações na corrente elétrica da *Flow cell* que permitem o tipo de nucleotídeo que passou, formando assim as *reads* para leitura do sequenciamento (31,32).

Os bancos de dados para análise WGS baseiam-se em princípio não muito diferentes das listas de certos alvos de PCR ou sondas de DNA para *microarrays*, embora os bancos de dados WGS tenham o potencial de conter mais alvos do que a maioria dos sistemas de PCR ou *microarray*. Em muitos casos, uma correlação clara entre um fenótipo de resistência e um determinado gene (de resistência) foi bem caracterizado por outro método, por exemplo, PCR ou *microarray*, o que torna relativamente fácil para incluir esses genes em um banco de dados de WGS. No entanto, a tarefa de construir um banco de dados abrangente cobrindo todas as variações genéticas possíveis para um determinado fenômeno de RAM é muito mais complexa pois muitos mecanismos genéticos podem ser responsáveis pela RAM e uma infinidade de mecanismos genéticos são responsáveis pelos fenótipos de resistência a diferentes agentes antimicrobianos (25).

A representação de toda a coleção de sequências genômicas encontradas em uma população ou espécie, que pode ser obtida pelas técnicas de WSG é chamada de Pangenoma. A pangenômica é a área da genômica que avalia o repertório inteiro de genomas disponíveis em um clado, grupo de organismos originados de um ancestral comum exclusivo – representados por um ramo na árvore filogenética (33).

O Pangenoma pode ser dividido em três principais partes: *core*; *shell* e *cloud*. O genoma *core* é a porção genômica compartilhada por todos os organismos de uma mesma espécie. Nele, estão contidos genes responsáveis pelo metabolismo e pelas

características fenotípicas mais importantes. O genoma *shell*, ou acessório, é identificado como a porção do pangenoma compartilhada por alguns dos genomas sequenciados, mas não por todos. Os genes contidos no genoma *shell* são também conhecidos como genes acessórios, que muitas vezes apresentam-se agrupados sob a forma de ilhas genômicas. Estes genes acessórios podem conferir vantagens adaptativas (e geralmente o conferem quando são preservados por muitas cepas diferentes), abrindo a possibilidade de ação de novas vias bioquímicas e funções adicionais àquelas executadas pelos genes do genoma core. O genoma *cloud*, por sua vez, contém genes únicos. Dessa forma, estes genes estão contidos em apenas um dos genomas que compõem o pangenoma e, semelhante àqueles presentes nos genomas *shell*, são chamados de genes dispensáveis (33,34).

O conhecimento da determinação genética para RAMs varia entre as espécies bacterianas e a sensibilidade dos bancos de dados dos genes para determinadas espécies pode ser muito baixa para ser aplicada ao WGS como uma ferramenta de decisão de primeira linha para tratamento devido ao risco de resultados falso-negativos. A aplicabilidade do WGS para esse propósito foi avaliada em relação aos patógenos mais comuns e a principal conclusão é que a evidência publicada disponível atualmente não apoia o uso da suscetibilidade inferida do WGS para orientar tomada de decisão clínica. Entretanto, os bancos de dados de destino são uma ferramenta valiosa para a vigilância local, regional e global da RAM, porque oferecem avaliações de variantes genéticas, que são difíceis de obter por métodos fenotípicos, bem como pela maioria dos outros métodos genotípicos (25).

Uma abordagem baseada no pangenoma, obtido por WGS permite rápidas reanálises de dados existentes cada vez que o banco de dados é atualizado. Existem ferramentas de bioinformática atualmente disponíveis para detectar determinantes genéticos para RAM. O número de ferramentas de bioinformática disponíveis gratuitamente para detecção de determinantes genéticos para RAM em dados WGS está aumentando constantemente. As ferramentas para anotação e identificação de genes de resistência estão disponíveis como serviços online e como programas independentes para serem baixados em um computador (25). As principais ferramentas online de acesso livre para a identificação de genes e sequências de resistência aos

antimicrobianos são ARG-ANNOT (*Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation*), CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*), ReSFinder, KmerResistance e SRT2 (24).

Métodos de determinação de clonalidade bacteriana e sua aplicação na vigilância de infecções causadas por RAM

A determinação da clonalidade entre isolados bacterianos por meio da análise do perfil de similaridade genética serve para distinguir e definir se os isolados possuem origem genética comum ou não. Assim, é possível mapear por exemplo se um surto de infecções teve fonte comum de origem, indicando ser causado por uma única linhagem, ou se é proveniente de diferentes linhagens bacterianas (35).

A similaridade genética entre isolados bacterianos pode ser determinada por meio molecular pela análise comparativa de *fingerprinting* de DNA ou também por análise comparativa de sequências gênicas. No primeiro caso, podem ser realizadas técnicas moleculares como amplificação gênica e comparação de perfil de restrição. No segundo, as análises comparativas podem ser realizadas por meio de sequenciamento de *amplicons* ou por meio da comparação de sequências gênicas obtidas em sequenciamento genômico (36). Avaliando a similaridade genética, podemos relacionar com a disseminação global de determinados clones bacterianos, permitindo entender as formas de disseminação dessas bactérias entre os países. Essa avaliação pode ser útil também em menor escala em investigações de surtos hospitalares por exemplo, permitindo que a análise da clonalidade das bactérias de um surto determine a presença da disseminação horizontal da bactéria, ou seja, transmissão de um paciente para outro na unidade de internação ou dentro de um ambiente hospitalar (37,38).

Um dos métodos de determinação do perfil de similaridade genética entre isolados bacterianos por *fingerprinting* é a reação em cadeia polimerase do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC PCR), que é um método simples e preciso para discriminar diferentes tipos de cepas bacterianas e que se baseia na técnica de PCR já descrita anteriormente (23,24,39). As sequências ERIC são descritas como regiões não codificantes curtas e altamente conservadas de 126 pares de bases nitrogenadas encontradas em Enterobacterales, diferentes da maioria das outras repetições genicas bacterianas. Essas sequências são palíndromos imperfeitos e foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli* e outros membros da família das Enterobacterales (24). O sucesso do ERIC-PCR como método de tipagem simplificado para um número amplo

e progressivamente crescente de organismos torna este método adequado para epidemiologia hospitalar ou epidemiologia localizada, por ser um método que requer reagentes mínimos e por ser de fácil execução (23,24).

O ERIC PCR utiliza uma combinação de primers projetados para a região conservada a fim de gerar um padrão de bandas identificáveis na eletroforese baseado na frequência e orientação das sequências ERIC em um genoma bacteriano. A genotipagem molecular por ERIC-PCR é mais rápida e econômica do que a eletroforese em gel de campo pulsado ou o sequenciamento genômico *multilocus* (MLST) para gerar informações sobre a similaridade genética de cepas bacterianas. Para muitos organismos essa técnica possui uma capacidade discriminatória maior do que outras técnicas, levando ao aumento da frequência de uso. Os resultados das análises obtidas pela técnica ERIC PCR permitem então avaliar a similaridade genética entre os isolados comparadas (24,39).

Análises de pangenoma consistem na determinação de similaridade genética de genomas. Tais análises possibilitam comparar a similaridade genética entre isolados de diferentes regiões geográficas pois utiliza sequências geradas por sequenciamento WGS e, também, disponíveis em bancos de dados (40). Esta abordagem permite identificar se há disseminação local, regional ou mundial de linhagens portadoras de RAM.

Diante do exposto, esse trabalho visa identificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, presença de genes de RAM e avaliação da clonalidade de quatro isolados de *Serratia marcescens* obtidos de amostras de hemoculturas de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva de um hospital terciário do Distrito Federal. Essa avaliação foi realizada por meio de abordagens fenotípicas, genotípicas, moleculares e genômicas. A análise de clonalidade por meio do ERIC PCR e da genômica permitiu rastrear a transmissão de *S. marcescens* dentro do ambiente hospitalar, confirmando a ocorrência de um surto hospitalar por essa bactéria e, também, identificando a presença de clones de disseminação mundial e no DF dessa espécie bacteriana (38).

JUSTIFICATIVA

O Hospital de Base do Distrito Federal, é o maior hospital terciário do DF, sendo responsável pela maioria dos casos de alta complexidade da Região Centro Oeste do Brasil. Neste hospital em particular, no período de janeiro de 2022 a setembro de 2023, *Serratias marcescens* foi responsável pela positividade de 763 amostras de material biológico de 384 pacientes, com uma média de 45% de resistência à carbapenêmicos, sendo a 4ª enterobactéria mais isolada em culturas neste período. Relacionadas às amostras de hemoculturas neste mesmo período, as *Serratia marcescens* foram a 9ª bactéria mais isolada, sendo a 3ª Enterobactéria mais comum nesse tipo de amostra e representando uma positividade de 132 amostras de hemoculturas de 68 pacientes, com uma média de 52% de sensibilidade aos carbapenêmicos. Em julho de 2022, quatro pacientes de uma mesma UTI deste hospital apresentaram bacteremia causada por *S. marcescens*. Todos os isolados bacterianos foram identificados como PDR e se destacaram por serem os primeiros identificados neste serviço com a coprodução de dois tipos de carbapenemases, NDM e KPC, uma metalo- β -lactamase e uma serino-carbapenemase respectivamente (dados de epidemiologia hospitalar local obtidos pelo Núcleo de Controle de Infecção do Hospital de Base do Distrito Federal).

Atualmente no Brasil, os isolados clínicos de *S. marcescens* CARB-R tem sido principalmente associado à produção de KPC-2 e, em menor grau, NDM-1. Isolados dessa espécie foram também descritos em animais de fazenda localizado na região amazônica brasileira o que reforça a interação entre a saúde animal e humana descritas pelo conceito de *One Health* da OMS (35). Foram também descritos 54 isolados de *Serratia marcescens* produtoras de KPC-2 em um surto hospitalar no Estado de Tocantins no Brasil, em unidades de terapia intensiva, esses isolados também foram avaliados pela técnica de ERIC PCR e demonstrado 86,4% de similaridade genética e 100% entre alguns desses isolados, sugerindo transmissão horizontal e fonte comum de infecção (12).

O único relato de *Serratia marcescens* coprodutora de KPC e NDM no Brasil encontrado até o momento, foi em 2021, em São Paulo, em que este perfil de *Serratia*

foi isolado em amostra de hemocultura entre 2012 e 2016. Desde então, até onde se sabe, não há mais registros publicados com esse perfil de coprodução no Brasil (41).

Frente à possibilidade de similaridade genética pelo perfil fenotípico e de disseminação intra-hospitalar desta bactéria, o conhecimento da cadeia de transmissão de linhagens bacterianas neste âmbito é imprescindível para definir estratégias de controle de infecção hospitalar. Abordagens que permitam comparar os isolados bacterianos são úteis para identificar se há transmissão intra-hospitalar e qual o modo de transmissão. Para estas finalidades, métodos de comparação de similaridade genética por *fingerprinting* de DNA e sequenciamento de genomas são ferramentas reconhecidamente eficazes que identificam a clonalidade dos isolados como já citado anteriormente.

Sabe-se que os métodos fenotípicos de detecção de RAM são de maior acessibilidade e exigem menor complexidade laboratorial. Porém, podem não apresentar sensibilidade no caso de isolados bacterianos que não estejam expressando os mecanismos de resistência no momento de sua realização. Frente à essa fragilidade, a detecção rápida e precisa dos mecanismos de resistência deve ser buscada para a identificação acurada do perfil de não susceptibilidade bacteriana em amostras de interesse. Neste contexto, a associação de técnicas fenotípicas com moleculares como genotipagem e sequenciamento de genomas tornam-se ferramentas adequadas para o diagnóstico preciso de infecções causadas por bactérias MDR/XDR/PDR e vigilância epidemiológica local e global (38).

A disseminação global de BGNs CARB-R tornou-se uma das maiores preocupações de saúde pública uma vez que esse fenótipo de resistência ocorre principalmente devido à produção de carbapenemases, que são as β -lactamases de maior espectro (1,7,11). Além dessa possibilidade de aquisição de genes de resistência a *S. marcescens* possui resistência intrínseca a diversos antimicrobianos incluindo polimixinas, que usualmente são opções terapêuticas para as BGNs CARB-R, reduzindo drasticamente as possibilidades terapêuticas para infecções causadas por essas bactérias (9).

Segundo o relatório anual do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) em 2017, isolados do gênero *Serratia spp.* foram o sexto patógeno bacteriano

causador de pneumonia nosocomial e o nono patógeno isolado em amostras de hemoculturas nas UTIs. (42) Dentre as bactérias causadoras de IRAS em UTIs no Distrito Federal (DF), *Serratia* spp é o terceiro BGN mais isolado em infecções primárias de corrente sanguínea (IPCS), superando a média nacional em que se encontra em quinto lugar. Em relação ao perfil de não susceptibilidade aos carbapenêmicos (CARB-R), as *Serratia* spp isoladas no DF também superam a média nacional de resistência que é de 40%, chegando a atingir neste estado pouco mais de 60% de resistência aos carbapenêmicos nos isolados de IPCS conforme perfil microbiológico da ANVISA em 2021 (43).

Diante do cenário mundial de RAM, do contexto atual de globalização e da dificuldade de definição de esquemas adequados para tratamento de infecções causadas por bactérias MDR/XDR/PDR, é fundamental para a prática clínica que sejam definidos os mecanismos de resistência presentes em isolados bacterianos relacionados às IRAS.

Assim, considerando a gravidade das infecções sanguíneas causadas por *S. marcescens* PDR devido à falta de possibilidades terapêuticas com antimicrobianos, é de suma importância que sejam identificados de forma robusta e precisa: (i) os mecanismos de resistência, a fim de estabelecer a terapêutica assertiva para o tratamento das infecções; (ii) o perfil de similaridade genética entre os isolados, para se determinar a clonalidade e o padrão de disseminação bacteriana visando definir medidas eficazes de controle de infecções hospitalares e (iii) a análise do perfil de RAM para epidemiologia local. Neste contexto é imprescindível que os isolados sejam analisados por meio das diferentes técnicas disponíveis para se estabelecer métodos rápidos e precisos para o diagnóstico e para a determinação de medidas mitigadoras de surtos hospitalares.

Por estas razões, este estudo caracterizou o perfil de não susceptibilidade a antimicrobianos dos quatro isolados de *S. marcescens* de interesse por serem possíveis causadores de um surto de IPCS na UTI do Hospital de Base do DF por meio de diferentes técnicas: fenotípicas, moleculares e genômicas. As caracterizações aqui utilizadas auxiliam na compreensão dos mecanismos de transmissão das bactérias e possibilita ajustes na melhoria dos processos de prestação de serviços e qualidade e segurança ao

paciente tanto localmente quanto em uma esfera global de análise de disseminação de RAM.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar a clonalidade e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Serratia marcescens* causadores de bacteremia utilizando abordagens fenotípicas, moleculares e genômicas.

Objetivos específicos

- Identificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de quatro isolados de *S. marcescens* obtidos de hemocultura de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital terciário de alta complexidade do Distrito Federal;
- Identificar a presença de mecanismos de RAM por diferentes metodologias para análise comparativa entre as técnicas fenotípicas, genotípicas e genômicas;
- Determinar a similaridade genética entre os isolados visando rastrear a transmissão horizontal no setor hospitalar por meio de abordagem molecular (ERIC-PCR) e por análise de pangenoma;

MATERIAL E MÉTODOS

Ética em Pesquisa

Este trabalho foi conduzido de acordo com as normativas e resoluções estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IGES/DF (Instituto de Gestão Estratégica em Saúde do Distrito Federal) no parecer 6.513.471 do protocolo CAAE 15482619.0.0000.8153.

Isolados bacterianos

Foram analisadas quatro isolados de *Serratia marcescens*, oriundas do cultivo de amostras de hemoculturas de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva de um hospital terciário no Distrito Federal. As amostras foram definidas como de interesse dentre as 763 amostras isoladas no período de janeiro de 2022 a setembro de 2023 por serem amostras de pacientes de uma mesma UTI internados no mesmo período, na mesma unidade de internação e por serem isolados com perfil de resistência nunca identificado anteriormente no hospital em questão, levando à suspeita de surto hospitalar por cepa bacteriana com novo perfil de resistência. Os dados de isolamentos das linhagens bacterianas estão na tabela 1. O relato do surto referente a esses isolados foi publicado com as devidas caracterizações das amostras e quadro clínico dos pacientes envolvidos (44).

Tabela 1 - Dados dos isolados clínicos de *Serratia marcescens*

Identificação do isolado	Data de coleta da amostra positiva	Data de internação hospitalar
1	11/07/2022	22/05/2022
2	22/07/2022	14/07/2022
3	23/07/2022	23/07/2022
4	24/08/2022	24/08/2022

As amostras de sangue foram incubadas em equipamento de hemocultura automatizado (Bactec FX BD) e semeadas em meios de cultura tradicionais (Agar

chocolate, Agar sangue e Agar MacConkey) e incubadas por 18 a 24 h a 35°C em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, as colônias apresentando as mesmas características de crescimento nos meios de cultura foram utilizadas para preparo de um inóculo bacteriano em salina estéril que é dispensado em painéis (placas de micro-titulação) lidos em equipamento automatizado (Microscan Walkaway 96 plus) após um período de incubação de 16 h no próprio equipamento.

Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Os isolados foram testados em painéis modelo NC83 (Negative combo 83) que compreendem várias provas bioquímicas para identificação automatizada da espécie bacteriana e concentrações de 13 antimicrobianos (amicacina, gentamicina, ceftazidima, cefepime, meropenem, imipenem, ertapenem, aztreonam, ampicilina, piperacilina+tazobactam, ciprofloxacino, levofloxacino, sulfametoxazol+trimetoprim) para realização do antibiograma também de forma automatizada com interpretação segundo o documento do Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCast) 2023.

Posteriormente, foram realizados antibiogramas através do método de difusão de disco Stokes modificado em ágar de teste de sensibilidade diagnóstica para 43 antibióticos, sendo eles: Ciprofloxacino, Levofloxacino, Lomefloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino, Ácido nalidíxico, Amicacina, Estreptomicina, Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, Doripenem, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Cefaclor, Cfdme, Cefazolina, Cefotetan, Cefoxitina, Cefuroxima oral, Cefuroxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefixima, Cefepime, Ceftarolina, Aztreonam, Amoxicilina/clavulanato, Ampicilina/sulbactam, Piperacilina/tazobactam, Doxicilina, Minociclina, Tetraciclina, Nitrofurantoína, Sulfonamida, Sulfametoxazol/trimetoprim, Trimetoprim, Cloanfenicol, Fosfomicina, Colestimetato, Tigeciclina.

Foram considerados os pontos de corte do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI 2022) para definir susceptibilidade dos antibióticos testados. As espécies

bacterianas utilizadas como controle no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Realização de testes fenotípicos para detecção de carbapenemases

Os isolados por terem apresentado resistência aos carbapenêmicos pelos testes de susceptibilidade automatizadas e por disco difusão foram submetidos a um teste rápido por imunocromatografia (NG test Carba5) para detecção dos principais tipos de carbapenemase circulantes (KPC, NDM, VIM, IMP e OXA48).

A detecção fenotípica de M β L foi posteriormente confirmada através da realização do teste com EDTA de acordo com a metodologia descrita por Leiros et al. (2012)(22), utilizando discos de imipenem (10 g) com e sem EDTA (10 mol·L⁻¹).

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico de todos os isolados foi realizada utilizando-se o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, segundo Covone et al. (1998). Após a extração, a concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas por análise espectrofotométrica, pelo equipamento *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*ThermoScientific*), empregando-se os comprimentos de onda (λ) de 260 e 280nm.

Todas as extrações de DNA demonstraram razão de 1,8 portanto, foram consideradas de boa qualidade, devido ao baixo nível de impurezas e, assim, o DNA genômico obtido foi considerado apto a ser utilizado nas reações de PCR.

Detecção de genes promotores de resistência antimicrobiana por PCR

Os quatro isolados foram submetidos à análise genotípica através da amplificação por PCR para investigar os principais genes de resistência. Foram pesquisados através

desse método os genes de produção de betalactamases *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VEB}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M-Gp8}, *bla*_{CTX-M-Gp9}, *bla*_{PER}, *bla*_{BEL}, *bla*_{SPM}, *bla*_{CTX-M-Gp1}, *bla*_{CTX-M-Gp2}

Os *primers* para amplificação dos genes de resistência estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para realização do PCR para detecção de genes de resistência.

GENES	PRIMERS (5'-3') F/R	REFERÊNCIA
<i>bla</i> _{KPC}	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	Dallenne et al 2010(45)
	ACGACGGCATAGTCATTTGC	
<i>bla</i> _{IMP}	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	Doyle et al 2012(16)
	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	
<i>bla</i> _{NDM}	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	Dallenne et al 2010(45)
	GGTCGCGAAGCTGAGCACCCGCAT	
<i>bla</i> _{GES}	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	Mendes et al 2007(21)
	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC	Climaco et al 2013(46)
	AATGCGCAGCACCCAGGATAG	
<i>bla</i> _{SPM}	GAGAGCCCTGCTTGGATTCAT	Dallenne et al 2010(45)
	CAGTCTCATTTCCGCAACGG	
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1}	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	Dallenne et al 2011(45)
	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CbTX-M-Gp2}	CGTTAACGGCACGATGAC	Dallenne et al 2010(45)
	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp9}	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	Dallenne et al 2010(45)
	TGATTCTCGCCGCTGAAG	
<i>bla</i> _{SHV}	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	Dallenne et al 2010(45)
	ATCCCGCAGATAAATCACCA	
<i>bla</i> _{VEB}	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	Dallenne et al 2010(45)
	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	
<i>bla</i> _{PER}	GCTCCGATAATGAAAGCGT	Dallenne et al 2010(45)
	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	
<i>bla</i> _{BEL}	AGACGTAAGCCTATAATCTC	Poirel et al 2005(47)
	GCGAATTGTTAGACGTATG	

Obs: embora *bla*_{CTX-M-Gp8} não conste na tabela, sua referência é Dallenne et al., 2010, a mesma presente na tabela.

Determinação da similaridade genética por ERIC- PCR

Para avaliar a similaridade genética dos quatro isolados bacterianos, foi realizado o *fingerprinting* DNA Enterobacteriano Repetitivo Intergênico (ERIC-PCR). Nessa técnica

foram amplificadas sequências intergênicas repetitivas presentes no genoma das enterobactérias. A distribuição dispersa de elementos repetitivos do DNA genômico permitiu observar o relacionamento genético dos isolados de *Serratia marcescens*.

A sequência dos iniciadores e as condições da reação de PCR foram, basicamente, as descritas por Versalovic et al. 1991 (48), com algumas modificações. Os iniciadores utilizados foram: ERIC1 ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC; e ERIC2 AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 50mL, contendo 27,75 mL de água ultrapura, 5mL de cada iniciador (25mM), 4mL de dNTP Mix (Takara), 5mL de Buffer (Takara), 0,25mL de Taq DNA Polimerase (Takara) e 3mL de DNA genômico (concentração de 20ng/mL).

As condições da reação foram as seguintes: inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 98°C durante 10 segundos; em seguida a amplificação foi realizada por 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; após os ciclos, foi feita uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em Tampão TAE. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp *ladder plus* (Sinapse Inc). Após o término da eletroforese, os géis corados em solução de brometo de etídio (0,5 mcg/ml), observados em transluminador de luz U.V. e registrados com sistema de fotodocumentação *L-Pix Touch* (Loccus). O padrão de bandas obtido foi comparado em duas reações de PCR diferentes.

Sequenciamento de genomas

Sequenciamento de DNA: Para o sequenciamento genômico foram utilizadas tecnologias de leituras longas da *Oxford Nanopore*[™] por meio dos dispositivos MinION[®]. O DNA genômico total das linhagens bacterianas foi extraído (DNeasey Ultraclean/NovePure Microbial Kit- Qiagen[®]) e as bibliotecas de sequenciamento foram criadas com o "The Oxford Nanopore MinION Genomic DNA Sequencing kit[®]" adquirido juntamente com os dispositivos MinION[®].

Anotação e análise de genomas: A montagem e anotação dos genomas foi realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Janssen et al., 2021). A montagem foi realizada na plataforma Flye v2.8 utilizando o pipeline MpGAP. A anotação foi realizada com *pipeline bacannot v2.2*, os genes de resistência detectados com CARD-RGI, AMR *plus finder e RES finder*. A tipagem molecular foi realizada de acordo com a espécie bacteriana utilizando-se bancos de dados de *Multi locus sequence typing* (38).

Uma vez de posse das amostras de DNA genômico dos isolados, foram preparadas bibliotecas de sequenciamento com o kit *rapid barcoding kit* SQK-RBK110.96 (*Oxford Nanopore technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento se deu na plataforma MinION por aproximadamente 18h, com o uso do programa MinKNOW. Os arquivos fast5 da categoria pass obtidos passaram por *basecalling* com o programa *guppy v6.0.1* (<https://github.com/BenjaminJPerry/nanoGuppy>), com o arquivo de configuração *dna_r9.4.1_450bps_hac.cfg*, dessa forma foram gerados os arquivos de extensão fastq. A partir dos arquivos fastq, a montagem foi feita com o programa *flye v.2.9.1-b1780* (Kolmogorov et al, 2019), com o argumento `-nano-hq` para *reads* de alta acurácia. Os contigs obtidos foram polidos com duas rodadas intercaladas dos programas *racon v.1.5.0* (<https://github.com/isovic/racon>) e *minimap2 v.2.26-r1175* (Li, 2021). A completude dos genomas foi avaliada com o programa BUSCO (Simão et al, 2015) com o banco de dados *enterobacterales_odb10*. A identificação a nível de espécie de cada isolado se deu com o site TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>, Meier-Kolthoff e Göker, 2019). A tipagem dos plasmídeos foi feita com *MOB_suite* (Robertson et al, 2020) A anotação dos genomas foi feita com o programa *Prokka 1.14.6* (Seemann, 2014), com os argumentos `-- genus Serratia -- species marcescens`. A busca por genes de resistência foi feita por meio do site CARD-RGI (Alcock et al, 2023) (49–59).

Para as análises filogenéticas, foi utilizada a metodologia de Williams et al, 2022, com pequenas alterações. Genomas de *S.marcescens* entre 4,5mb e 6,5mb disponíveis no Genbank foram baixados (acesso no dia 23/10/23): `((txid613[organism:exp] AND biomol_genomic[prop]) AND "Serratia marcescens"[porgn] AND ("4500000"[SLEN] : "6500000"[SLEN]))`. Os genomas foram anotados com *Prokka* (Seemann et al, 2014), com ORFs de tamanho mínimo de 500 com seguinte script: `for file in *.fasta; do tag=${file%.fasta}; prokka --prefix "$tag" --locustag "$tag" --cpus 15 --usegenus --centre`

```
XXX --mincontiglen 500 --genus Serratia --species marcescens --strain "$tag" --outdir "$tag"_prokka --gcode 11 "$file"; done.
```

Os genomas dos isolados do presente trabalho foram reanotados com os mesmos parâmetros do script, para uma comparação direta entre eles. Com os genomas anotados, o pangenoma do conjunto de dados foi feito com programa Panaroo v1.3.0 (Tonkin-Hill et al, 2020), com os argumentos `-a core --clean-mode moderate`. O programa SNP-sites (Page et al, 2016) foi utilizado para manter apenas os sítios com A,T,G,C no alinhamento múltiplo. O alinhamento resultante foi analisado com o programa IQ-tree (Nguyen et al 2015), com o modelo de substituição escolhido GTR+F+ASC+R7 a partir do programa incluso modelfinder e a geração de 1000 bootstraps ultrafast para suporte estatístico, de forma a se gerar a filogenia baseada em pangenoma. A árvore filogenética resultante foi visualizada com o site itol (<https://itol.embl.de/>, Letunic e Bork, 2021) e enraizada em ponto médio (50–59).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação fenotípica da susceptibilidade antimicrobiana

De acordo com o Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCAST - <https://brcast.org.br/>), treze antibióticos (amicacina, gentamicina, ceftazidima, cefepime, meropenem, imipenem, ertapenem, aztreonam, ampicilina, piperacilina+tazobactam, ciprofloxacino, levofloxacino, sulfametoxazol+trimetoprim) foram testados pelo método automatizado painéis modelo NC83 (Negative combo 83) e os isolados não foram suscetíveis a nenhum dos antibióticos testados por esse método, sendo considerados Pan-resistentes (PDR). Além disso, de acordo com o CLSI (<https://clsi.org/>), o teste de suscetibilidade para 43 antibióticos (conforme Tabela 3) mostrou que os quatro isolados foram resistentes a todos os antibióticos testados, exceto dois isolados (isolado 2 e 4) que, diferentemente dos resultados pelo método automatizado, foram suscetíveis ao aztreonam conforme Tabela 3 e Figura 4. Vale ressaltar que houve um halo de inibição ao redor do disco de fosfomicina nos quatro isolados, como mostrado na Figura 4 indicado pelas setas brancas, porém, de acordo com o BrCast, não há padronização do tamanho de halo para inferir sensibilidade por esse método para Fosfomicina em *Serratia marcescens* não sendo estes portanto reportados como sensíveis (60).

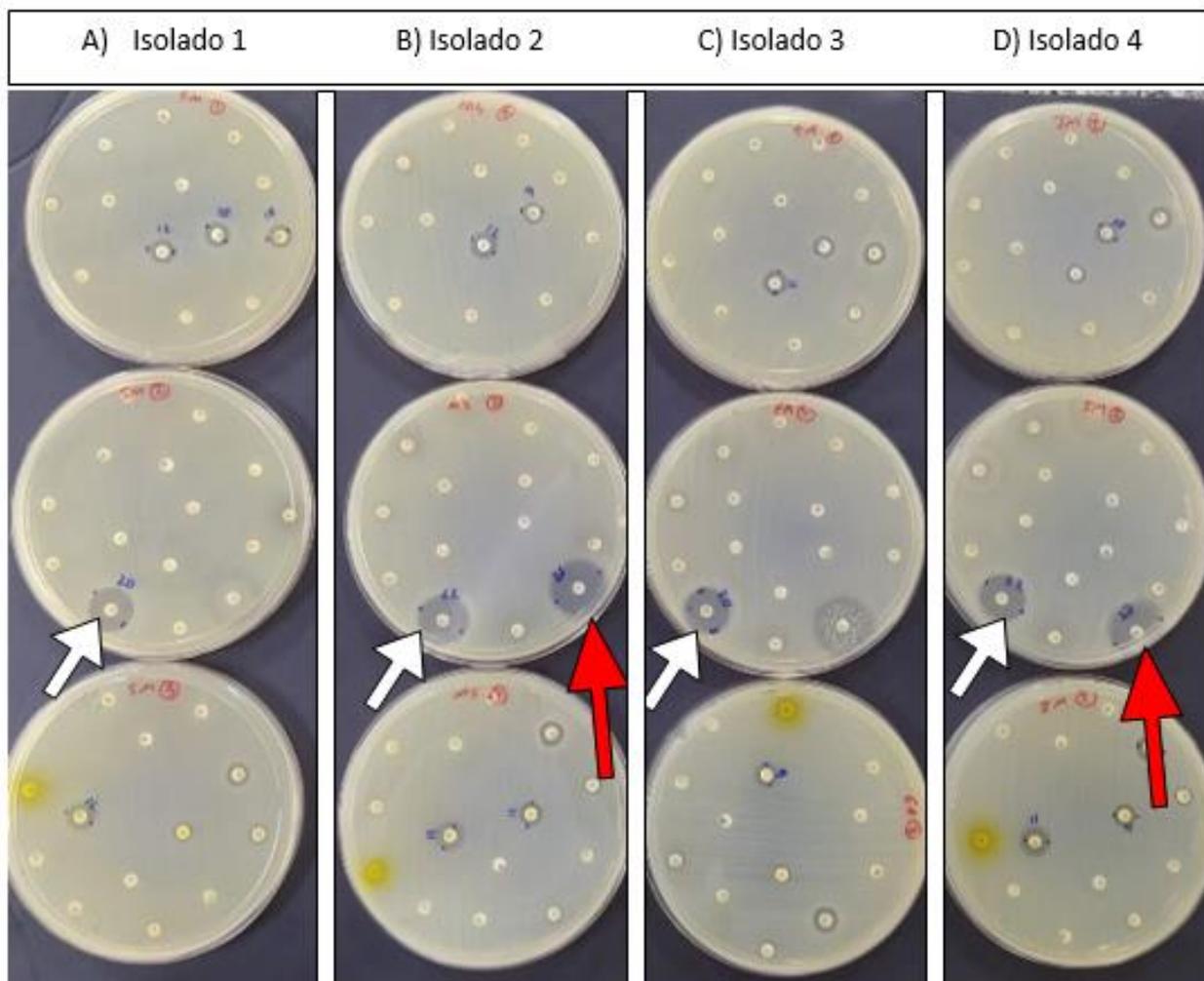


Figura 4 – Antibiograma para a determinação de susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco difusão. Setas brancas indicando o halo de inibição ao redor do disco de fosfomicina para os quatro isolados. Setas vermelhas mostrando o halo de inibição ao redor do disco de aztreonam nos isolados 2 e 4.

Tabela 3 - Perfil de não susceptibilidade a antimicrobianos determinado por teste de sensibilidade por disco difusão realizados para os quatro isolados utilizando critérios CLSI 2022.

CLASSE DOS ANTIMICROBIANOS	ANTIMICROBIANOS	ISOLADOS			
		1	2	3	4
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	R	R	R	R
	Levofloxacino	R	R	R	R
	Lomefloxacino	R	R	R	R
	Norfloxacino	R	R	R	R
	Ofloxacino	R	R	R	R
Quinolonas	Ácido nalidíxico	R	R	R	R
Aminoglicosídeos	Amicacina	R	R	R	R
	Estreptomicina	R	R	R	R
	Gentamicina	R	R	R	R
	Tobramicina	R	R	R	R
	Netilmicina	R	R	R	R
Carbapenêmicos	Doripenem	R	R	R	R
	Ertapenem	R	R	R	R
	Imipenem	R	R	R	R
	Meropenem	R	R	R	R
Cefalosporinas	Cefaclor	R	R	R	R
	Cfz ^{dme}	R	R	R	R
	Cefazolina	R	R	R	R
	Cefotetan	R	R	R	R
	Cefoxitina	R	R	R	R
	Crx ^o	R	R	R	R
	Cefuroxima	R	R	R	R
	Ceftazidima	R	R	R	R
	Ceftriaxona	R	R	R	R
	Cefotaxima	R	R	R	R
	Cefixima	R	R	R	R
	Cefepime	R	R	R	R
	Ceftarolina	R	R	R	R
	Aztreonam	R	S	R	S
Monobactâmicos	Amoxicilina/clavulanato	R	R	R	R
	Ampicilina/sulbactam	R	R	R	R
	Piperacilina/tazobactam	R	R	R	R
Penicilinas associada a inibidores de betalactamase	Doxicilina	R	R	R	R
	Minociclina	R	R	R	R
	Tetraciclina	R	R	R	R
Tetraciclinas	Doxicilina	R	R	R	R
	Minociclina	R	R	R	R
	Tetraciclina	R	R	R	R
Nitrofuran	Nitrofurantóina	R	R	R	R
Inibidores da via de folato	Sulfonamida	R	R	R	R
	Sulfametoxazol/trimetoprim	R	R	R	R
	Trimetoprim	R	R	R	R
Fenicol	Cloanfencol	R	R	R	R
Derivados do ácido fosfônico	Fosfomicina	NP	NP	NP	NP
	Polimixina	NP	NP	NP	NP
Glicilglicina	Tigeciclina	NP	NP	NP	NP

Legenda: S: sensível; R: resistente, NP: técnica não padronizada para essa classe de antimicrobianos.

Para a determinação do perfil de susceptibilidade à polimixina, utiliza-se a técnica de microdiluição. Contudo, este teste não foi realizado uma vez que *Serratia* são intrinsecamente resistentes à esta classe de antimicrobiano devido às mutações nos genes cromossomais *arnB* e *arnC*, associados à síntese de LPS (61).

Os testes fenotípicos para a produção de β -lactamases carbapenemase, NG test Carba5, foram realizados logo após os testes de sensibilidade por método automatizado, e foram positivos para KPC e NDM nos quatro isolados e negativo para VIM, IMP e OXA48. Esse achado levantou a hipótese inicial de serem isolados de origem clonal comum e potencial causadoras de surto hospitalar, uma vez que esse perfil de resistência de coprodução KPC e NDM nunca tinha sido observado no hospital em questão e se referiam à pacientes internados em uma mesma unidade (UTI). Há poucos relatos disponíveis mostrando a identificação de linhagens de *S. marcescens* portadoras de KPC e NDM. Entre eles há dois provenientes de nasofaringe isolados de pacientes do Peru (62) e um de infecção sanguínea de São Paulo, isolado em 2016 (41).

Os testes de EDTA, para a detecção de metalo- β -lactamases, realizados posteriormente demonstraram resistência aos carbapenêmicos em todos os isolados pela presença de carbapenemases do tipo metalo- β -lactamases (EDTA positivo) em todos os isolados (figura 5) reforçando a hipótese de origem clonal comum pelo perfil fenotípico semelhante.

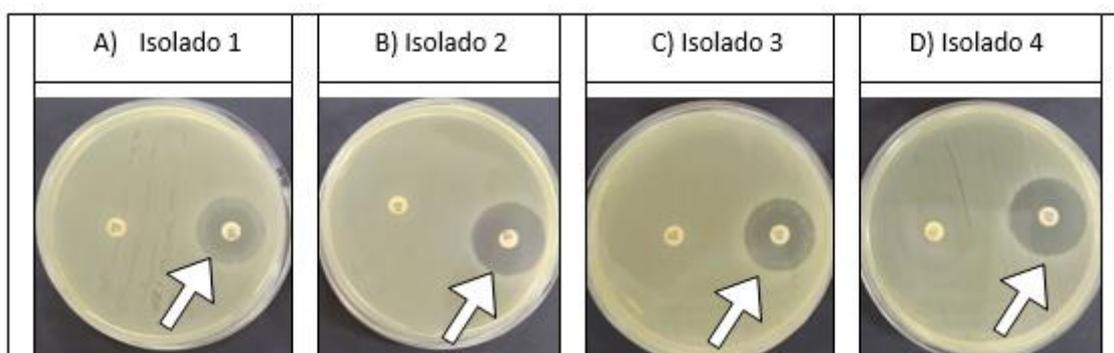


Figura 5 – Antibiograma por disco difusão para a detecção de carbapenemases do tipo metalo- β -lactamases. Em cada placa os discos da esquerda foram impregnados com imipenem (carbapenêmico) e os discos da direita foram impregnados com imipenem e edta. Resultados de teste fenotípico pela técnica EDTA, as Setas apontando o halo de inibição ao redor do disco impregnado por EDTA confirmando a presença de metalo- β -lactamases em todas os isolados.

Determinação molecular da resistência antimicrobiana

Na amplificação por PCR, o gene *bla*_{NDM} foi detectado em todos os isolados, confirmando os resultados do teste fenotípico do EDTA, que identificou a produção da metalo-β-lactamase NDM pelos 4 isolados. Contudo, o gene *bla*_{KPC}, que indica a produção da carbapenamase KPC, foi detectado apenas nos isolados 1 e 3 (figura 6). Ambos, também se apresentaram resistentes ao aztreonam no teste de disco difusão (Figura 4 e Tabela 3), característica de hidrólise desta carbapenamase. Intrigantemente, a produção de KPC foi detectada pelo teste NG Carb5 para os 04 isolados. Contudo, essa carbapenamase não foi detectada pela genotipagem nos isolados 2 e 4 (figura 6), os mesmos que apresentaram sensibilidade ao Aztreonam (Tabela 3).

Vale ressaltar que o teste fenotípico imunocromatográfico foi realizado no mesmo período que o teste de sensibilidade automatizado e com as amostras frescas e sem congelamento prévio. Os isolados foram então congelados para posteriormente serem submetidos aos testes de disco difusão e amplificação de genes por PCR. Essa manipulação pode estar relacionada com a divergência de resultados conforme discutiremos mais à frente.

Outros genes que foram investigados na amplificação por PCR, mas não foram detectados incluíram *bla*_{VEB}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M-Gp8}, *bla*_{CTX-M-Gp9}, *bla*_{PER}^{*}, *bla*_{BEL}^{*}, *bla*_{SPM}, *bla*_{CTX-M-Gp1}^{*}, *bla*_{CTX-M-Gp2}^{*}.

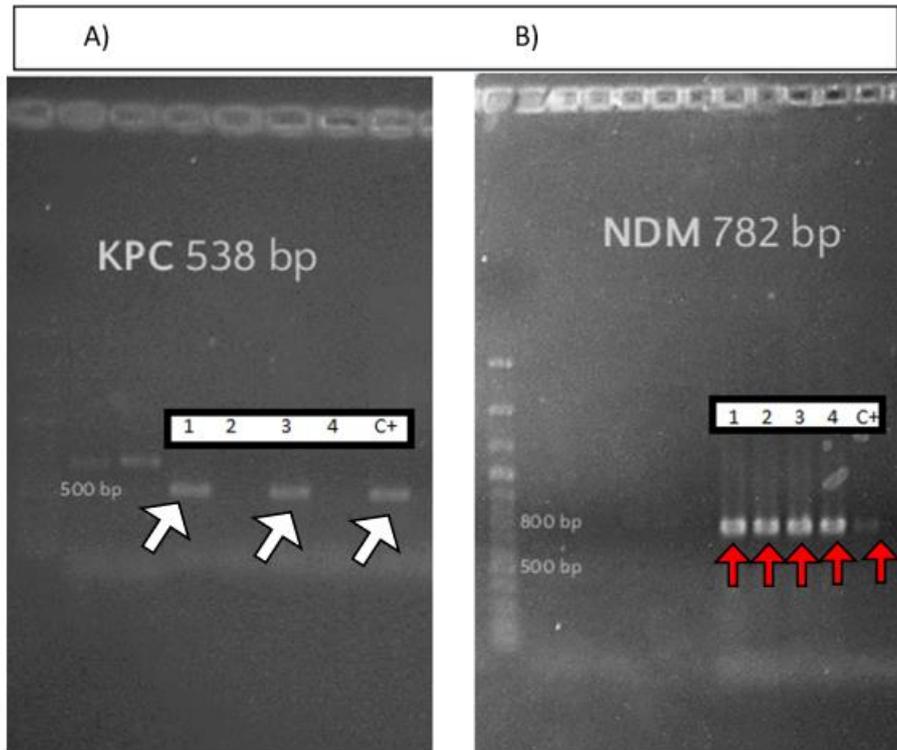


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) contendo o produto da amplificação dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* através da técnica de PCR. A) Setas brancas indicando as linhas de amplificação do gene *bla_{KPC}* nos isolados 1 e 3 e no controle positivo. B) setas vermelhas indicando as linhas de amplificação do gene *bla_{NDM}* em todos os isolados e no controle positivo.

Determinação do perfil de similaridade genética por ERIC-PCR

Conforme mostrado na Figura 7, o perfil eletroforético gerado pela amplificação de sequências ERIC demonstrou que a similaridade genética dos quatro isolados bacterianos (1,2,3 e 4) é de 100%. Estes dados indicam que as infecções sanguíneas dos 04 pacientes (Tabela 1) foram causadas por uma única linhagem bacteriana de *S. marcescens*, sugerindo a contaminação dos pacientes no setor hospitalar (UTI). É importante destacar que, apesar de geneticamente idênticos, 02 isolados não apresentaram o gene para a produção de KPC *bla_{KPC}* (figura 6). Esse resultado, pode sugerir a aquisição horizontal de *bla_{KPC}*, por via plasmidial, desse gene pelos isolados 1 e 3 não alterando o perfil de clonalidade entre os isolados mesmo após a aquisição desse gene.

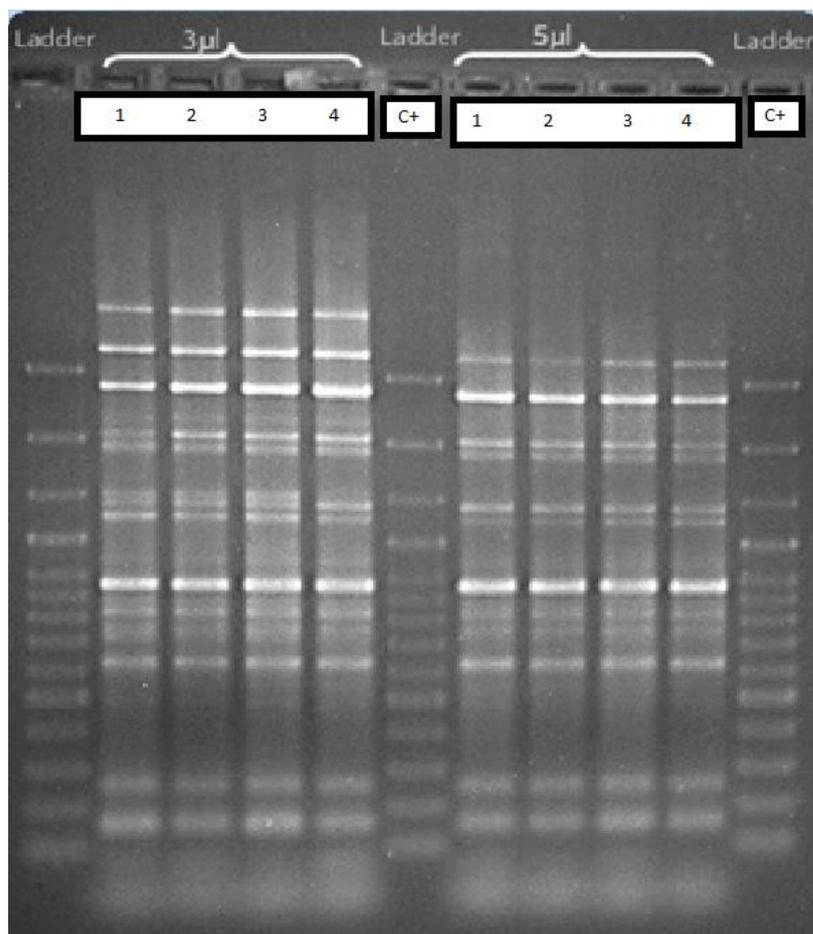


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1%) contendo o produto da amplificação de sequencias ERIC por meio de PCR. O perfil eletroforético apresentou-se idêntico para todos os isolados demonstrando 100%de similaridade genética para esta técnica.

Os dados de similaridade genética dos isolados de estão de acordo com relatos anteriores de surtos, uma vez que, *S. marcescens* possui uma plasticidade e capacidade adaptativa o que a permite sobreviver em vários ambientes, dentre eles o hospitalar (10). A caracterização de surtos causados por *S. marcescens* em unidade hospitalar na Califórnia, EUA, demonstraram que surtos infecciosos foram causados por isolados pertencentes a um mesmo *cluster* genético evidenciam que a linhagens bacterianas associados a surtos hospitalares apresentam baixa diversidade genética (63).

As infecções causadas por *S. marcescens* geralmente acometem indivíduos suscetíveis, imunossuprimidos ou que já tenham sido expostos à tratamentos antimicrobianos prévios, como é o caso dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva ou unidades de neonatologia. Em 2023 foi publicado um surto que ocorreu em 2021, causados por *Serratia marcescens* em uma unidade de neonatologia

no México, 15 neonatos com sinais de sepse apresentaram *Serratia marcescens* na hemocultura, neste caso, porém não foram feitas análises genotípicas para confirmar a relação clonal entre os isolados (64). Outros surtos já foram relatados em unidades de neonatologia inclusive por isolados com perfil de resistência aos carbapenêmicos, produtores de metalo- β -lactamases, um deles reportado no Cairo, Egito, com isolados produtores de IMP e VIM (65). Entretanto, apesar de já terem sido relatados esses e outros surtos por esse microrganismo, o perfil de resistência PDR como o encontrado no presente trabalho não é comum (38,41,66,67).

Análise genômica dos isolados e determinação da susceptibilidade antimicrobiana por sequenciamento WGS

Os resultados da análise genômica referente aos mecanismos de resistência e genes preditores de resistência dos isolados 1, 2, 3 e 4 estão resumidos nas tabelas 4, 5, 6 e 7 respectivamente. Os dados obtidos demonstram genes de não susceptibilidade a todas as classes de antimicrobianos em todos os isolados, inclusive à fosfomicina (que apresentou halo no teste de disco-difusão apesar de não haver ponto de corte para definir sensibilidade por este método) e ao aztreonam, reportado como sensível nos isolados 2 e 4 pelo método de disco difusão.

Tabela 4 – Determinação do perfil de não susceptibilidade antimicrobiana por meio da análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 1.

Isolado 1		
Classe de antimicrobianos	Mecanismo de resistência	Gene preditor do mecanismo de resistência
Fluorquinolonas	Bomba de efluxo	<i>adeF</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP, <i>rsmA</i>
	Inativação do antibiótico	<i>aadA2</i> , AAC(6')-Ib-cr6
	Alteração do sítio de ligação	QnrB1
Aminoglicosídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	AAC(6')-Ic, AAC(3)-Ile, AAC(6')-Ib-cr6, APH(3')-Via
Carbapenêmicos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Cefalosporinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Monobactâmicos	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}
Tetraciclinas	Bomba de efluxo	<i>adeF</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Inibidores da via de folato	Alteração do sítio de ligação	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i>
Fenicol	Bomba de efluxo	<i>rsmA</i>
Derivados do ácido fosfônico	Inativação do antibiótico	FosA8
Polimixinas	---	---
Glicilglicina	----	----
Macrolídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP
Rifamicinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Desinfetantes e agentes antissépticos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>qacG</i> , <i>qacEdelta1</i>
Glicopeptídeos	Alteração do sítio de ligação	VanG , BRP(MBL)

Tabela 5 – Determinação do Perfil de não susceptibilidade antimicrobiana por meio da análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 2.

Isolado 2		
Classe de antimicrobianos	Mecanismo de resistência	Gene preditor do mecanismo de resistência
Fluorquinolonas	Bomba de efluxo	OqxB
	Inativação do antibiótico	AAC(6')-Ib-cr6; aac(6')-Ib-cr
	Alteração do sítio de ligação	QnrB1
Aminoglicosídeos	Inativação do antibiótico	AAC(6')-Ic, AAC(6')-Ib-cr6, aph(3')-Via; aadA2; aac(3)-IIa; aph(3')-Via; aac(3)-IIa;
Carbapenêmicos	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1}
Cefalosporinas	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1B}
Monobactâmicos	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}
Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}
Inibidores da via de folato	Alteração do sítio de ligação	sul1, sul2, dfrA12, OqxB;
Fenicol	Bomba de efluxo	OqxB; catB3

Tabela 6 – Determinação do Perfil de não susceptibilidade antimicrobiana por meio da análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 3

Isolado 3		
Classe de antimicrobianos	Mecanismo de resistência	Gene preditor do mecanismo de resistência
Fluorquinolonas	Bomba de efluxo	adeF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP, rsmA
	Inativação do antibiótico	aadA2, AAC(6')-Ib-cr6
	Alteração do sítio de ligação	QnrB1
Aminoglicosídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	AAC(6')-Ic, AAC(3)-Ile, AAC(6')-Ib-cr6, APH(3')-Via, AAC(3)-Ia
Carbapenêmicos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	bla _{NDM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Cefalosporinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	bla _{NDM-1} , bla _{OXA-1} , bla _{SRT-2} , bla _{TEM-1} , bla _{TEM-116}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Monobactâmicos	Inativação do antibiótico	bla _{OXA-1} , bla _{TEM-1} , bla _{TEM-116}
Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase	Inativação do antibiótico	bla _{NDM-1} , bla _{OXA-1}
Tetraciclinas	Bomba de efluxo	adeF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Inibidores da via de folato	Alteração do sítio de ligação	sul1, sul2, dfrA12
Fenicol	Bomba de efluxo	rsmA
Derivados do ácido fosfônico	Inativação do antibiótico	FosA8
Polimixinas		
Glicilglicina		
Macrolídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP
Rifamicinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Desinfetantes e agentes antissépticos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, qacG, qacEdelta1
Glicopeptídeos	Alteração do sítio de ligação	VanG, BRP(MBL)

Tabela 7 – Determinação do perfil de não susceptibilidade antimicrobiana por meio da análise genômica de genes e mecanismos de resistência do isolado 4.

Isolado 4		
Classe de antimicrobianos	Mecanismo de resistência	Gene preditor do mecanismo de resistência
Fluorquinolonas	Bomba de efluxo	<i>adeF</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP, <i>rsmA</i>
	Inativação do antibiótico	<i>aadA2</i> , AAC(6')-Ib-cr6
	Alteração do sítio de ligação	QnrB1
Aminoglicosídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	AAC(6')-Ic, AAC(3)-Ile, AAC(6')-Ib-cr6, APH(3')-Via
Carbapenêmicos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Cefalosporinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Monobactâmicos	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{Oxa-1} , <i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}
	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase	Alteração do sítio de ligação	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
	Inativação do antibiótico	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}
Tetraciclinas	Bomba de efluxo	<i>adeF</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Inibidores da via de folato	Alteração do sítio de ligação	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
Fenicol	Bomba de efluxo	<i>rsmA</i>
Derivados do ácido fosfônico	Inativação do antibiótico	FosA8
Polimixinas		
Glicilglicina		
Macrolídeos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH, CRP
Rifamicinas	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
Desinfetantes e agentes antissépticos	Bomba de efluxo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF, <i>qacG</i>
Glicopeptídeos	Alteração do sítio de ligação	VanG

Análise comparativa da genômica dos isolados

Foi realizada a análise comparativa dos genes preditores de resistência presente nos isolados conforme Tabela 8. A presença de detecções repetidas de alguns genes significa a detecção destes em mais de um local de inserção no genoma. Porém, para determinar a “super expressão” do marcador de resistência é necessário realizar análises de expressão proteica, como análise de transcritos e proteômica, análises não realizadas neste trabalho.

Tabela 8 - Genes preditores de resistência bacteriana detectados por genômica nos isolados 01, 02, 03 e 04.

Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Isolado 4
--	--	AAC(3)-Ia	--
--	aac(3)-IIa;	--	--
AAC(3)-Ile	--	AAC(3)-Ile	AAC(3)-Ile
AAC(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr ??	AAC(6')-Ib-cr6	AAC(6')-Ib-cr6
AAC(6')-Ic	aac(6')-Ic	AAC(6')-Ic	AAC(6')-Ic
aadA2	aadA2	aadA2	aadA2
adeF	--	adeF	adeF
adeF	--	adeF	adeF
adeF	--	adeF	adeF
adeF	--	adeF	adeF
APH(3')-Via	aph(3')-Via	APH(3')-Via	APH(3')-Via
ArnT	--	ArnT	ArnT
BRP(MBL)	--	BRP(MBL)	----
CRP	--	CRP	CRP
--	catB3	--	--
--	--	--	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu
--	--	--	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu
dfrA12	dfrA12	dfrA12	----
FosA8	--	FosA8	FosA8
<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3	--	--	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	--	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH	--	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH
<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1}
qacEdelta1	--	qacEdelta1	----
qacG	--	qacG	qacG
QnrB1	QnrB1	QnrB1	QnrB1
--	OqxB;	--	--
rsmA	--	rsmA	rsmA
<i>bla</i> _{SRT-2}	<i>bla</i> _{SRT-2}	<i>bla</i> _{SRT-2}	<i>bla</i> _{SRT-2}
sul1	sul1	sul1	sul1
sul2	sul2	sul2	sul2
<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{TEM-1B}
vanG	--	vanG	vanG
--	--	<i>bla</i> _{TEM-116}	--

A tabela 08 demonstra que a maioria das sequências associadas à RAM foram identificadas nos 03 isolados. Contudo, a sequência associada a pulvomycina (*Escherichia coli* EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin) foi identificada apenas no isolado 03; o gene PBP3 para resistência aos beta-lactâmicos (*Haemophilus influenzae* PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics) foi detectado no isolado 03; o gene dfrA12 associado à resistência às sulfas foi identificado nos isolados 01 e 03, assim como qacEdelta1 que promove resistência a detergentes; e, apenas o isolado 03 apresentou TEM-116 que medeia resistência a beta-lactâmicos. O isolado 02 apresentou menores quantidades de genes de resistência identificados conforme tabela 05 e 08, uma vez que não houve extensão de 100% do seu genoma na análise, apenas 86%, o que pode justificar a ausência de detecção de alguns genes presentes nos demais isolados com extensão de 100% na análise genômica. Outro fator que pode justificar a ausência de detecção de alguns genes, incluindo o *bla_{KPC}*, é a instabilidade plasmidial por redundância da função, uma vez que já existem outros genes produtores de carbapenemases, ou ainda por baixas cópias do gene no plasmídeo.

Os resultados da detecção de genes de resistência pelos testes fenotípicos, genotípicos e genômicos foram inseridos em tabela única para uma análise comparativa de detecção de RAM (Tabela 9). Nota-se que a análise genômica oferece uma detecção muito mais completa dos genes e determinantes RAM visto que pelas técnicas de amplificação por PCR apenas os genes pesquisados serão potencialmente amplificados pelos primers previamente selecionados. Por sua vez, os testes fenotípicos possibilitam a detecção da expressão dos determinantes de RAM, contudo, muitas vezes estes fatores podem estar presentes no genoma bacteriano, porém sem expressão no momento do teste fenotípico, possibilitando resultados falsos negativos nestes testes.

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas fenotípicas, genotípicas e genômicas.

	Genes identificados na análise imunocromatográfica	Genes identificados na análise genômica.	Genes identificados na amplificação por PCR
AAC(3)-Ia	Não realizado	Sim	Não realizado
AAC(3)-Ile	Não realizado	Sim	Não realizado
AAC(6')-Ib-cr6	Não realizado	Sim	Não realizado
AAC(6')-Ic	Não realizado	Sim	Não realizado
aadA2	Não realizado	Sim	Não realizado
adeF	Não realizado	Sim	Não realizado
adeF	Não realizado	Sim	Não realizado
adeF	Não realizado	Sim	Não realizado
adeF	Não realizado	Sim	Não realizado
APH(3')-Via	Não realizado	Sim	Não realizado
ArnT	Não realizado	Sim	Não realizado
BRP(MBL)	Não realizado	Sim	Não realizado
CRP	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants	Não realizado	Sim	Não realizado
dfrA12	Não realizado	Sim	Não realizado
FosA8	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>bla</i> _{NDM-1}	Sim	Sim	Sim
<i>bla</i> _{OXA-1}	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>bla</i> _{OXA-48}	Não	Não	Não
qacEdelta1	Não realizado	Sim	Não realizado
qacG	Não realizado	Sim	Não realizado
QnrB1	Não realizado	Sim	Não realizado
rsmA	Não realizado	Sim	Não realizado
SRT-2	Não realizado	Sim	Não realizado
sul1	Não realizado	Sim	Não realizado
sul2	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>bla</i> _{TEM-1}	Não realizado	Sim	Não realizado
vanG	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>bla</i> _{TEM-116}	Não realizado	Sim	Não realizado
<i>bla</i> _{KPC}	Sim	Não	Sim
<i>bla</i> _{VEB}	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{IMP}	Não	Não	Não
<i>bla</i> _{VIM}	Não	Não	Não
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp8}	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp9}	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{PER} *	Não realizado	Não	Não

<i>bla</i> _{BEL} *	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{SPM} *	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{CTX-M-Gp1} *	Não realizado	Não	Não
<i>bla</i> _{CTX-MGp2} *	Não realizado	Não	Não

Legenda: * teste realizado, porém em controle positivo na amplificação por PCR.

Os resultados obtidos demonstraram que o mecanismo de resistência mais frequente nestes isolados hospitalares foram as enzimas carbapenemases. Em dois isolados, a presença da carbapenamase KPC foi confirmada fenotipicamente e molecularmente pela amplificação por PCR, porém o gene codificador dessa enzima não foi detectado na análise genômica conforme destacado na Tabela 8.

A ausência da detecção deste gene pela análise genotípica em alguns isolados e na genômica em todos, pode ser devida a instabilidade genômica do *bla*_{KPC}, uma vez que, tal análise foi realizada posteriormente às análises fenotípicas e à PCR e após o congelamento dos isolados bacterianos. Essa hipótese justificaria também a sensibilidade ao Aztreonam, apresentada no teste fenotípico por disco difusão conforme figura 4, uma vez que a amplificação por PCR foi realizada no mesmo momento da análise fenotípica por esse método, quando pode ter ocorrido a perda dos genes *bla*_{kpc} nos isolados 2 e 4. Neste momento, as amostras haviam sido congeladas para posterior análise, e as amostras dos isolados 2 e 4 foram mais manipuladas do que as amostras 1 e 3, justificando a possibilidade de maior risco de perda de genes por instabilidade neste momento da análise. A figura 8 resume as etapas das análises realizadas nesse trabalho e a hipótese que justificaria a discrepância dos resultados entre os testes realizados. Este resultado de discrepância entre os testes genotípicos e genômicos já foi descrito anteriormente em um estudo que detectou a mesma divergência de resultados entre os testes fenotípicos e genotípicos/genômicos para genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. (41).

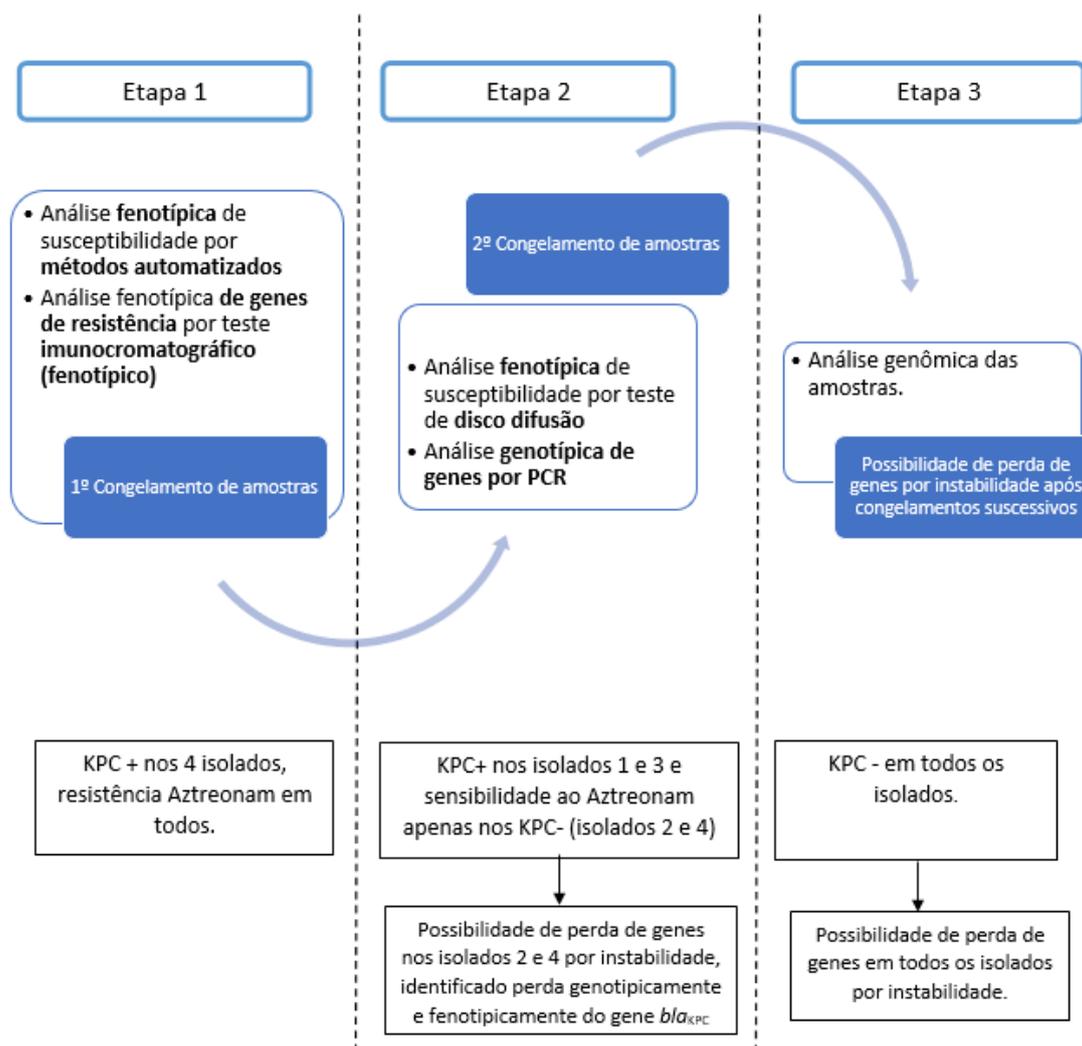


Figura 8 - Fluxograma das etapas metodológicas e momentos de congelamento das amostras que pode justificar a instabilidade do gene *bla_{KPC}* e divergência entre resultados fenotípicos, genotípicos e genômicos.

Neste contexto, de instabilidades de alguns genes e fragilidades que os métodos de amplificação por PCR e genômica podem apresentar, os testes fenotípicos podem ser mais diretos para a detecção desses mecanismos de resistência por serem testes de menor necessidade de densidade tecnológica e de realização mais rápida com amostras mais frescas. Assim, estes achados determinam que testes genotípicos de amplificação por PCR bem como os testes de genômica, devem ser realizados com colônias frescas e sem terem passado por muitos processos de congelamento para que se evite a instabilidade dos genes e consequente perda de sequências gênicas.

Podemos observar também, que a sensibilidade ao Aztreonam identificada pelo método fenotípico de disco difusão após possível perda do gene *bla_{KPC}* pode não ser uma

sensibilidade real, que traduziria uma possibilidade terapêutica para os casos de infecção por esses isolados, uma vez que na análise genômica identificou-se a presença de outros genes relacionados à resistência à essa droga, conforme tabelas 3,4,5 e 6. Isso se justifica pela possibilidade de a análise genômica identificar a presença de genes que não estão sendo expressos a todo momento, o que justifica a não detecção dessa resistência em testes fenotípicos de susceptibilidade por exemplo. Por esse motivo, a análise genômica para genes de resistência é mais abrangente do que as demais metodologias, pois não depende de *primers* específicos para amplificação dos genes e não depende da expressão gênica para detecção da presença dos genes de resistência.

Determinação da similaridade genética dos isolados por análise de pangenoma.

As sequências genômicas obtidas para os isolados 1, 3 e 4 foram submetidas a análises de pangenoma para se determinar o perfil de similaridade genética entre os isolados e entre isolados de *S. marcescens* oriundos de diferentes amostras e diferentes regiões geográficas. A similaridade genética foi representada em árvore filogenética gerada por meio da comparação de SNPs com visualização no *website* itol (Figura 9).

A figura 08 demonstra que, os isolados 1,3 e 4 são clonais e pertencem ao mesmo clado com alta confiabilidade estatística. Apesar de não haver grupos clonais tão bem estabelecidos para o gênero da *Serratia* como existem para outras enterobactérias como *Klebsiella* (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=schemeInfo&scheme_id=13) e *Escherichia coli* (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef), é possível verificar que os isolados 1,3 e 4 possuem uma proximidade genética com linhagens isoladas nos Estados Unidos e no Japão conforme (figura 10). Esses clones possuem mecanismos de virulência semelhantes como por exemplo o gene *pfKA*, que são genes que favorecem infecções de corrente sanguínea por *Serratia*. Ambos foram relatados também em infecções de corrente sanguínea que ocorreram em UTIs.

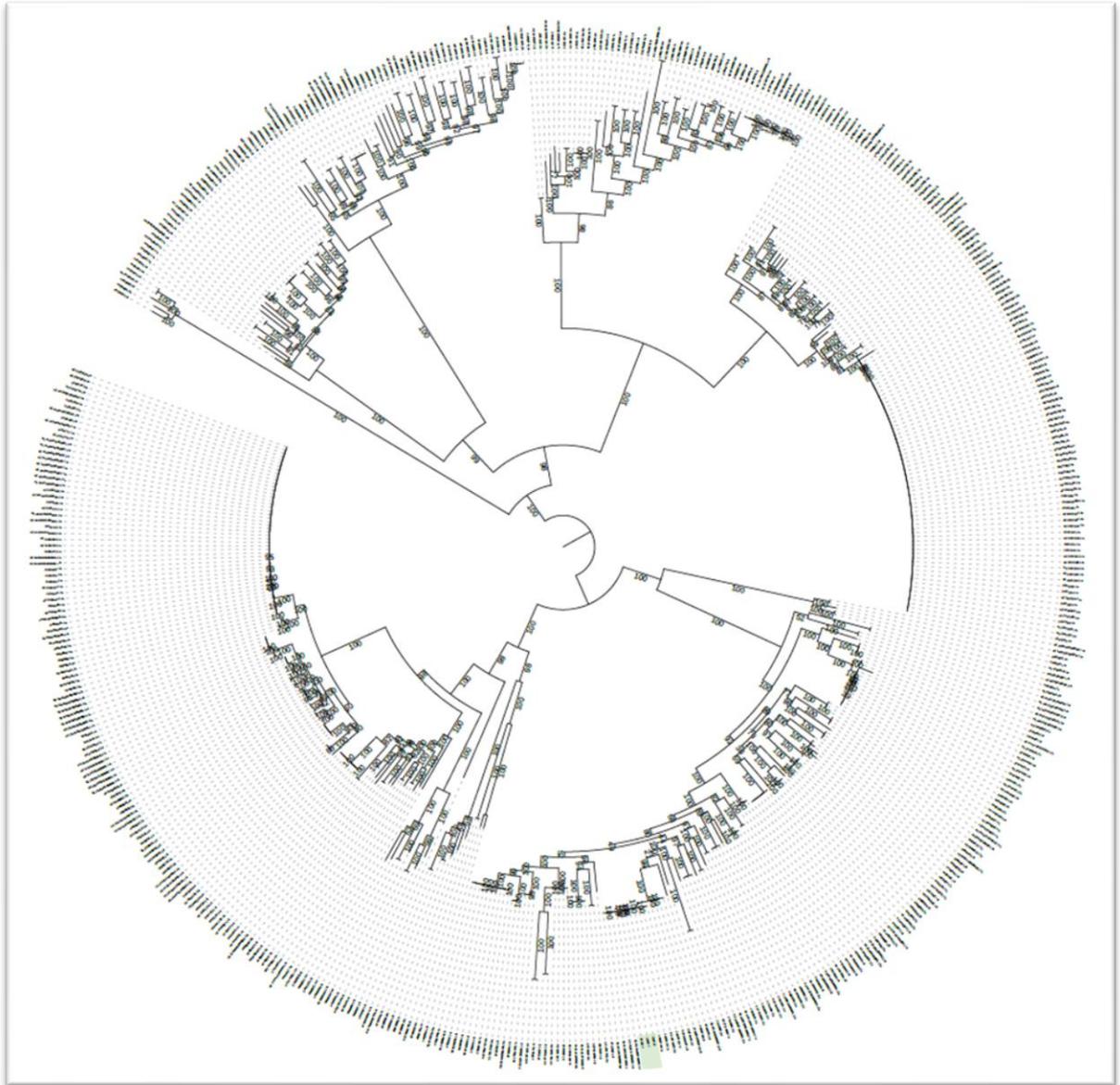


Figura 9 – Árvore filogenética após análise do genoma dos isolados 1, 3 e 4

CONCLUSÕES

No Brasil a avaliação genômica não é realizada de forma rotineira nos laboratórios clínicos, apenas em ambientes de pesquisa. Isso se deve ao fato de ainda ser uma tecnologia de alto valor e as técnicas não serem amplamente difundidas entre os profissionais. Incluir este processo de análise genômica na prática laboratorial está se tornando cada vez mais viável visto que a relativa baixa densidade tecnológica para análises genômicas com equipamentos como MinION (Oxford Nanopore) possibilita a descentralização desse método e capilarização para laboratórios de menor complexidade. Essa capilarização da técnica de análise genômica reduziria os riscos de perdas dos genes por processos de congelamentos como o ocorrido neste trabalho. A descentralização dessa tecnologia também favoreceria a vigilância das bactérias multirresistentes e evitaria a sobrecarga de trabalho em laboratórios centrais, que muitas vezes não conseguem processar todas as amostras referenciadas.

Após discussões sobre os resultados, vantagens e desvantagens de cada método para análise de genes de resistência das espécies de *Serratia marcescens* analisadas, podemos concluir que a capilarização e a maior disponibilidade dos equipamentos de análise genômica nas bancadas de laboratórios de menor complexidade pode favorecer as análises de amostras de interesse por permitir que não ocorram perdas genéticas por instabilidades pós manipulações dos isolados e por facilitar o fluxo de análise de amostras. Com a capilarização dessa tecnologia, os centros de referências, que atualmente seriam os responsáveis por essas análises, teriam mais disponibilidade para se aprimorarem na mão de obra qualificada para análise dos bancos de genomas e vigilância nacional dos genes detectados nas amostras.

Podemos também concluir que:

- As análises fenotípicas e genômicas utilizadas para determinação do perfil de não susceptibilidade indicaram que todos os isolados apresentaram resistência a todos antimicrobianos disponíveis sendo assim classificados como PDRs;
- As análises genômicas por WGS demonstrou-se mais precisa e profunda do que a genotipagem, pois não há viés gerado pela seleção de primers específicos;

- As análises genômicas por WGS demonstrou-se mais precisa e profunda do que a fenotípica, pois identifica presença de genes de resistência que podem não estar expressos no momento da realização do antibiograma;
- Foram observadas discrepâncias na detecção de KPC entre as análises genômicas, genotípicas e fenotípicas, provavelmente devido à instabilidade de *bla_{KPC}*;
- Os isolados apresentaram 100% de similaridade genética por *fingerprinting* de DNA e por análise de pangenoma, indicando que possuem uma única origem clonal demonstrando que as bacteremias provavelmente tem origem comum no ambiente hospitalar e ocorreram por transmissão horizontal entre pacientes configurando surto na unidade de internação;
- A análise WGS demonstrou-se precisa e robusta para a determinação de não susceptibilidade antimicrobiana para *Serratia marcescens*, contudo deve ser realizada imediatamente após a obtenção dos isolados para evitar perdas de plasmídeos de baixo número de cópias;
- A análise WGS demonstrou-se precisa e robusta para identificar a cadeia de contaminação/infecção por meio da determinação da clonalidade bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization - WHO [Internet]. [cited 2023 Jun 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>
2. Center For Disease Control and Prevention - CDC [Internet]. [cited 2023 Jun 7]. Available from: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
3. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]. 2015. Available from: www.paprika-annecy.com
4. Mills JP, Marchaim D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Dec;35(4):969–94.
5. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. Vol. 12, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
6. Rice LB. Antimicrobial Stewardship and Antimicrobial Resistance. Vol. 102, *Medical Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 805–18.
7. Centers for Disease Control U. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 [Internet]. Available from: www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html.
8. Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, Albayat H, Al-Adsani W, Sabour AA, et al. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant Enterobacterales. Vol. 58, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. NLM (Medline); 2022.
9. Tavares-Carreón F, de Anda-Mora K, Rojas-Barrera IC, Andrade A. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ*. 2023 Jan 5;11.
10. Tavares-Carreón F, de Anda-Mora K, Rojas-Barrera IC, Andrade A. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ*. 2023 Jan 5;11.
11. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017.
12. Ferreira RL, Rezende GS, Damas MSF, Oliveira-Silva M, Pitondo-Silva A, Brito MCA, et al. Characterization of KPC-Producing *Serratia marcescens* in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital. *Front Microbiol*. 2020 May 20;11.
13. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/How-Germs-Fight-Back-Against-Antibiotics.pdf>.
14. Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A, Morales-Espinosa R. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front Microbiol*. 2018 May 11;9(MAY).
15. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of multidrug-resistant enterobacterales—from esbls to carbapenemases. Vol. 10, *Antibiotics*. MDPI; 2021.

16. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitouta JDD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec;50(12):3877–80.
17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure [Internet]. Vol. 39, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.* 1995. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
18. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010. p. 969–76.
19. Guliy OI, Evstigneeva SS, Karavaeva OA. Antimicrobial Resistance and Current Methods for its Detection. Vol. 15, *Frontiers in Bioscience - Elite.* IMR Press Limited; 2023.
20. Teste rápido para a detecção de carbapenemases KPC OVI e N em uma colônia bacteriana de cultura. RA 10097010 172 A 646001 NTC 5 K 20T L 172311 Rev 04 – 07/2022. <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/172311-04-Bula-NG-Carba-5.pdf>. 2022.
21. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):544–7.
22. Leiros HKS, Borr PS, Brandsdal BO, Edvardsen KSW, Spencer J, Walsh TR, et al. Crystal structure of the mobile metallo- β -lactamase AIM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into antibiotic binding and the role of Gln157. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Aug;56(8):4341–53.
23. Bakhshi B, Afshari N, Fallah F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2018 Jul 1;49(3):529–33.
24. Hulton CSJ, Higgins' CF, Sharp^ PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Vol. 5, *Molecular Microbiology.* 1991.
25. Anjum MF, Zankari E, Hasman H. Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiol Spectr.* 2017 Dec 7;5(6).
26. Wrenn DC DDM. Nanopore Adaptive Sampling Enriches for Antimicrobial Resistance Genes in Microbial Communities. *bioRxiv [Preprint].* 2023 Jun 30;
27. Chen P, Sun Z, Wang J, Liu X, Bai Y, Chen J, et al. Portable nanopore-sequencing technology: Trends in development and applications. *Front Microbiol.* 2023 Feb 1;14.
28. Smith C, Halse TA, Shea J, Modestil H, Fowler RC, Musser KA, et al. Assessing Nanopore Sequencing for Clinical Diagnostics: a Comparison of Next-Generation Sequencing (NGS) Methods for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1).
29. Pugh J. The Current State of Nanopore Sequencing. In 2023. p. 3–14.
30. Hall MB, Rabodoarivelo MS, Koch A, Dippenaar A, George S, Grobbelaar M, et al. Evaluation of Nanopore sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and outbreak investigation: a genomic analysis. *Lancet Microbe.* 2023 Feb;4(2):e84–92.

31. <https://nanoporetech.com/products/sequence/minion>.
32. <https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html>.
33. Sherman RM, Salzberg SL. Pan-genomics in the human genome era. *Nat Rev Genet*. 2020 Apr 7;21(4):243–54.
34. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae* : Implications for the microbial “pan-genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Sep 27;102(39):13950–5.
35. Valiatti TB, Bessa-Neto FO, Santos FF, Silva RGB, Veiga R, Cassu-Corsi D, et al. Clonal dissemination of highly virulent *Serratia marcescens* strains producing KPC-2 in food-producing animals. *One Health*. 2023 Dec 1;17.
36. Hamzah AS. Molecular Typing of *fumC*, *icd*, and *mdh* Genes in *Serratia Marcescens*. *J Pharm Bioallied Sci*. 2023 Jul 1;15(6):S871–4.
37. Hou J, Mao D, Zhang Y, Huang R, Li L, Wang X, et al. Long-term spatiotemporal variation of antimicrobial resistance genes within the *Serratia marcescens* population and transmission of *S. marcescens* revealed by public whole-genome datasets. *J Hazard Mater*. 2022 Feb 5;423.
38. Rossen JWA, Dombrecht J, Vanfleteren D, De Bruyne K, van Belkum A, Rosema S, et al. Epidemiological Typing of *Serratia marcescens* Isolates by Whole-Genome Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. 2019 Apr;57(4).
39. Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. *JOURNAL OF PATHOLOGY Iranian Journal of Pathology*. 2017;12(1):25–34.
40. Mustapha MM, Srinivasa VR, Griffith MP, Cho ST, Evans DR, Waggle K, et al. Genomic Diversity of Hospital-Acquired Infections Revealed through Prospective Whole-Genome Sequencing-Based Surveillance. *mSystems*. 2022 Jun 28;7(3).
41. Bes T, Nagano D, Martins R, Marchi AP, Perdigão-Neto L, Higashino H, et al. Bloodstream Infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021 Dec 1;20(1).
42. European Centre for Disease Prevention and Control HAIA in ICUAER for 2017. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf. 2017.
43. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoizDIwZjYyMzUtMmYxZS00MTRjLTk0NWMTZWE2ZDUzOGRjOTVjIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWwzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ>
9. The Brazilian Health Regulatory Agency - ANVISA, Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 25: Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM), Ano 2021. 2021.

44. Vanni T, Sudbrack LO, de Campos TA, da Silva RN, da Silva AP, Estefani RP, et al. Outbreak of extensively drug-resistant *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology*. 2023 Nov 6;3(1):e200.
45. Dallenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Jan 12;65(3):490–5.
46. Clímaco EC, Oliveira ML de, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013 Oct;19:127–33.
47. Poirel L, Docquier JD, De Luca F, Verlinde A, Ide L, Rossolini GM, et al. BEL-2, an extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward expanded-spectrum cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):533–5.
48. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Vol. 19, *Nucleic Acids Research*.
49. Phan HTT, Stoesser N, Maciucă IE, Toma F, Szekely E, Flonta M, et al. Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1 *Serratia marcescens* outbreak in Romania. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Mar 1;73(3):672–9.
50. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol*. 2019 May 1;37(5):540–6.
51. Li H. New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics*. 2021 Dec 7;37(23):4572–4.
52. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E V., Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*. 2015 Oct 1;31(19):3210–2.
53. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun*. 2019 May 16;10(1):2182.
54. Robertson J, Bessonov K, Schonfeld J, Nash JHE. Universal whole-sequence-based plasmid typing and its utility to prediction of host range and epidemiological surveillance. *Microb Genom*. 2020 Oct 1;6(10).
55. Williams DJ, Grimont PAD, Cazares A, Grimont F, Ageron E, Pettigrew KA, et al. The genus *Serratia* revisited by genomics. *Nat Commun*. 2022 Sep 3;13(1):5195.
56. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol*. 2020 Dec 22;21(1):180.
57. Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, et al. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb Genom*. 2016 Apr 29;2(4).

58. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015 Jan;32(1):268–74.
59. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jul 2;49(W1):W293–6.
60. BrCAST. Conteúdo Página Informação adicional [Internet]. Available from: <http://www.brcast.org.br>
61. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014 Nov 26;5.
62. Ymaña B, Luque N, Pons MJ, Ruiz J. KPC-2-NDM-1-producing *Serratia marcescens*: first description in Peru. *New Microbes New Infect.* 2022 Nov 1;49–50.
63. Ferguson D, Ryder R, Lunsford R, Dash A, Kamali A, Kimura A, et al. *Serratia marcescens* Outbreak at a Correctional Facility: Environmental Sampling, Laboratory Analyses and Genomic Characterization to Assess Sources and Persistence. *Int J Environ Res Public Health.* 2023 Sep 4;20(17):6709.
64. Guel-Gomez M, Angulo-Zamudio UA, Leon-Sicairos N, Flores-Villaseñor H, Mendivil-Zavala E, Plata-Guzmán A, et al. Outbreak of *Serratia marcescens* in the Neonatal Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in Mexico. Saggiu G, editor. *Adv Med* [Internet]. 2023 Sep 21;2023:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/amed/2023/3281910/>
65. Ghaith DM, Zafer MM, Ismail DK, Al-Agamy MH, Bohol MFF, Al-Qahtani A, et al. First reported nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* harboring blaIMP-4 and blaVIM-2 in a neonatal intensive care unit in Cairo, Egypt. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2211–7.
66. Guel-Gomez M, Angulo-Zamudio UA, Leon-Sicairos N, Flores-Villaseñor H, Mendivil-Zavala E, Plata-Guzmán A, et al. Outbreak of *Serratia marcescens* in the Neonatal Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in Mexico. Saggiu G, editor. *Adv Med* [Internet]. 2023 Sep 21;2023:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/amed/2023/3281910/>
67. Prado G, Mendes ET, Martins RCR, Perdigão-Neto LV, Freire MP, Marchi AP, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. *Int J Antimicrob Agents.* 2022 Jan 1;59(1).