

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

GRAZIELA SILVA REZENDE

Caracterização fenotípica e molecular da
susceptibilidade antimicrobiana em *Serratia*
marcescens isoladas de pacientes em um hospital
terciário do estado de Tocantis.

SÃO CARLOS -SP

2019

GRAZIELA SILVA REZENDE

Caracterização fenotípica e molecular da susceptibilidade antimicrobiana em *Serratia marcescens* isoladas de pacientes em um hospital terciário do estado de Tocantis.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos-SP

2019




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Graziela Silva Rezende, realizada em 20/02/2019:



Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Prof. Dr. André Pitondo da Silva
USP

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus,
por ser essencial em minha vida,
autor de meu destino, meu guia,
socorro presente na hora da angústia,
ao meu pai Roberto Rezende,
minha mãe Dulce Helena Silva Rezende
e ao meu irmão Luiz Fernando Silva Rezende.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, por me dar força e coragem para nunca desistir.

Ao orientador desta dissertação Doutor Anderson Ferreira da Cunha, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

À co-orientadora Professora Doutora Maria Cristina da Silva Pranchevicius, pela sua disponibilidade em todo o decorrer do trabalho, pela paciência, pelo seu incentivo, e pelo seu igual apoio para a realização desse trabalho, a qual em muito contribuiu.

À Me. Roumayne Ferreira Lopes por toda colaboração com o trabalho.

À toda minha família, pelo apoio, confiança, por todo carinho e atenção e por acreditarem em minhas capacidades.

À todos os amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram nos momentos difíceis.

Agradeço ao Professor Dr André Pitondo da Silva por todo apoio e colaboração com nosso trabalho.

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução, pela disponibilidade e apoio.

À Universidade Federal de São Carlos por proporcionar meios para a realização desse trabalho e por me dar a oportunidade de prosseguir com minha carreira na área científica.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

*O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss).*

RESUMO

Serratia marcescens é um membro da família *Enterobacteriaceae* com resistência intrínseca a vários grupos antimicrobianos. Neste estudo, 54 cepas de *Serratia marcescens* isoladas dos pacientes internados na unidade de terapia intensiva de um hospital terciário do Tocantins, Brasil, foram caracterizadas fenotipicamente e geneticamente. Uma grande parte dos isolados de *S. marcescens* (n = 13, 24.07%) foram classificados como multidroga-resistentes (MDR), com alto nível de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tigeciclina e colistina. Nossos dados confirmaram a presença de genes em *S. marcescens*, que conferem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos. Análises de PCR mostraram que todos os isolados (n = 54, 100%) abrigaram os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{TEM}, 7 (12.96%) foram positivos para *bla*_{CTX-M-15}, 8 (14.81%) para o gene *bla*_{OXA-1}. Os genes das beta-lactamases *bla*_{VIM-1} e *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV} e *bla*_{IMP-2} e o gene que confere resistência à colistina *mcr-1* não foram encontrados. A técnica ERIC-PCR foi empregada para determinar as relações clonais entre as cepas. Os resultados mostraram uma alta similaridade genética entre as linhagens, indicando que as *S. marcescens* circulantes nessa UTI são altamente relacionados geneticamente. O padrão de resistência apresentado pelos isolados clínicos de *S. marcescens* e o potencial de transmissão desses clones, observado em nosso estudo é muito preocupante, pois sugere-se que são importantes disseminadores de infecções hospitalares. Portanto, medidas que propiciem a eliminação de fontes de desenvolvimento de resistência e dos reservatórios dessas bactérias são de extrema importância para o controle dessas infecções.

Palavras-chave: *Serratia marcescens*, multidroga-resistentes, genes.

ABSTRACT

Serratia marcescens is a member of *Enterobacteriaceae* family with intrinsic resistance to various antimicrobial groups. In this study, 54 strains of *Serratia marcescens* isolated from patients admitted to the intensive care unit of a tertiary hospital in Tocantis, Brazil, were characterized phenotypically and genetically. A large part of *S. marcescens* isolates (n = 13, 24.07%) were classified as multidrug-resistant (MDR), with a high level of resistance to β -lactam antibiotics, aminoglycosides, quinolones, tigecycline and colistin. Our data confirmed the presence of genes in *S. marcescens*, which confer resistance to beta-lactam antibiotics, including carbapenems. PCR analyzes showed that all the isolates (n = 54, 100%) harbored the blaKPC-2 and blaTEM genes, 7 (12.96%) were positive for blaCTX-M-15.8 (14.81%) for the blaOXA-1 gene. The beta-lactamases genes blaVIM-1 and blaNDM-1, blaSHV and blaIMP-2 and the gene conferring resistance to colistin mcr-1 were not found. The ERIC-PCR technique was used to determine the clonal relationships between the strains. The results showed a high genetic similarity between the lines, indicating that *S. marcescens* circulating in this UTI are highly genetically related. The resistance pattern presented by *S. marcescens* clinical isolates and the potential transmission of these clones, observed in our study, is very worrying, since it is suggested that they are important disseminators of hospital infections. Therefore, measures that eliminate the sources of resistance development and the reservoirs of these bacteria are of extreme importance for the control of these infections.

Keywords: *Serratia marcescens*, multidrug-resistant, genes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A CÉLULA BACTERIANA	14
1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS.....	16
1.2.1 Inibição da síntese da parede celular	17
1.2.2 Inibição da síntese de proteínas.....	17
1.2.3 Inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição.....	18
1.2.4 Dano à membrana plasmática	19
1.2.5 Inibição da síntese de metabólitos essenciais	19
1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	20
1.3.1 Bombas de efluxo	21
1.3.2 Redução da permeabilidade da membrana externa	21
1.3.3 Alteração do sítio alvo.....	22
1.3.4 Inativação enzimática- Produção de beta-lactamases.....	23
1.4 DETECÇÃO DE CARBAPENAMASES PELOS LABORATÓRIOS.....	28
1.5 INTRODUÇÃO	30
1.5.1 SERRATIA MARCESCENS	30
2. OBJETIVO GERAL	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 CEPAS BACTERIANAS	33
3.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	33
3.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	33
3.4 ANÁLISE FENOTÍPICA	35
3.4.1 Teste de Hodge	35
3.4.2 Teste para Metallo-beta-lactamase	35
3.5 ANÁLISES MOLECULARES	36
3.5.1 Extração de DNA.....	36
3.5.2 Detecção de genes de resistência a múltiplas drogas	36
3.6 TIPAGEM MOLECULAR E ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS	37
3.6.1 Consenso Intergênico Repetitibo Enterobacteriano (ERIC-PCR).....	37
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICAS	38

4. RESULTADOS	39
4.1 CARACTÉRISTICAS GERAIS.....	39
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.3 ANÁLISE FENOTÍPICA	40
4.4 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS.....	43
4.5 CONSENSO INTERGÊNICO REPETITIVO ENTEROBACTERIANO	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferença da membrana de bactérias gram-negativas e gram-positivas	15
Figura 2. Mecanismos de ação dos antibióticos	16
Figura 3. Mecanismos de resistência das bactérias	21
Figura 4. Classificação de Ambler's	24
Figura 5. (A) Número de amostras por sítio de isolamento de <i>S. marcescens</i> (B) Características dos pacientes de <i>S. marcescens</i>	39
Figura 6. Perfil de resistência aos antibióticos analisados em relação ao sexo de <i>S. marcescens</i>	41
Figura 7. Heatmap de classificação multidroga-resistente de <i>S. marcescens</i>	42
Figura 8. Análise do perfil fenotípico de <i>S. marcescens</i>	43
Figura 9. Perfil genotípico de <i>S. marcescens</i>	44
Figura 10. Géis de agarose dos genes de resistência de <i>S. marcescens</i>	45
Figura 11. Produtos das reações de ERIC-PCR de <i>S. marcescens</i>	46
Figura 12. Dendograma de <i>S. marcescens</i>	47
Figura 13. Géis de agarose dos genes de resistência de <i>S. marcescens</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de Bush Medeiros Jacoby.....	25
Tabela 2- Sequência dos primers de resistência pra <i>S. marcescens</i>	37
Tabela 3- Análise estatística de <i>S. marcescens</i>	40
Tabela 4- Coprodução dos genes de resistência de <i>S. marcescens</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

OM- Membrana exterior

LPS- Lipopolissacarídeos

DNA- Ácido desoxirribonucléico

MDR- Multidroga- resistente

XDR- Extensivamente- resistente

PDR- Pandroga- resistente

PBP- Penicillin-binding proteins

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

ESBL- Beta-lactamase de espectro extendido

KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases

MBL- metalo- beta-lactamase

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RT-PCR - PCR real-time

UTI - Unidade de terapia intensiva

LACEN-TO - Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Tocantis

CIM- Concentrações inibitórias mínimas

CLSI- USA- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EUCAST- Comitê Europeu para o Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

AMP - Ampicilina

SAM - Ampicilina-sulbactam

PIPE- Piperacilina

TZP- Piperacilina-tazobactam

CXM - Cefuroxima

FOX - Cefoxitina

CAZ - Ceftazidima

CRO - Ceftriaxona

FEP - Cefepima

ERP - Ertapenem

IMP - Imipenem

MEM - Meropenem

AMK - Amicacina

GEN - Gentamicina

CIP - Ciprofloxacina

TGC - Tigeciclina

CST - Colistina

ERIC-PCR - Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano

UV- Ultra violeta

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aparecimento de bactérias multirresistentes e a falta de disponibilidade de novos antimicrobianos tem representado uma ameaça iminente aos protocolos de tratamento estabelecidos para agentes de doenças infecciosas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a resistência bacteriana a medicamentos deveria ser vista há muito tempo como um problema de saúde pública mundial, principalmente no âmbito hospitalar. Nos hospitais, as infecções de maiores preocupações são as encontradas em unidades que atendem pacientes em cuidado crítico, entre elas, as Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006), que são consideradas reservatórios e fontes de disseminação das bactérias multirresistentes (ANVISA, 2007).

A emergência e a disseminação de inúmeros patógenos tanto de origem nosocomial quanto comunitária resultam da combinação de múltiplos fatores, tais como: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas nas quais os genes de resistência são transferidos para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e disseminação de clones multirresistentes, os quais podem ocorrer em nível global (TENOVER, 2001).

O surgimento de resistência antimicrobiana é inevitável para quase todos os novos medicamentos, e é reconhecido como um grande problema no tratamento de infecções microbianas em hospitais e comunidades (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

1.1 A célula bacteriana

A célula é a unidade estrutural básica e funcional de todos os seres vivos (SOUSA et al., 2016). Após o aparecimento da microscopia eletrônica, tornou-se possível a observação

detalhada da estrutura íntima das células nos diferentes seres vivos, distinguindo-se dois tipos de organização celular: procariota e eucariota (SOUSA et al., 2016).

As bactérias são os únicos microrganismos patogênicos procariotas (RIBEIRO et al., 2013). A maioria das bactérias possui uma parede rígida, que constitui o principal suporte mecânico da célula, confere estabilidade e é responsável pela forma das células. A parede celular permite, ainda, fazer a distinção entre dois tipos de bactérias: as bactérias de Gram-positiva e as bactérias de Gram-negativa, uma vez que esta estrutura condiciona a coloração de Gram (RIBEIRO et al., 2013). As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa, homogênea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano (Figura 1). Nas bactérias Gram-negativas, a parede é mais complexa e estratificada, em que uma das camadas é constituída por peptidoglicano e a outra – membrana exterior (OM) – constituída por lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e fosfolípidos (Biologia Celular e Molecular, Carlos Azevedo - Livro - WOOK).

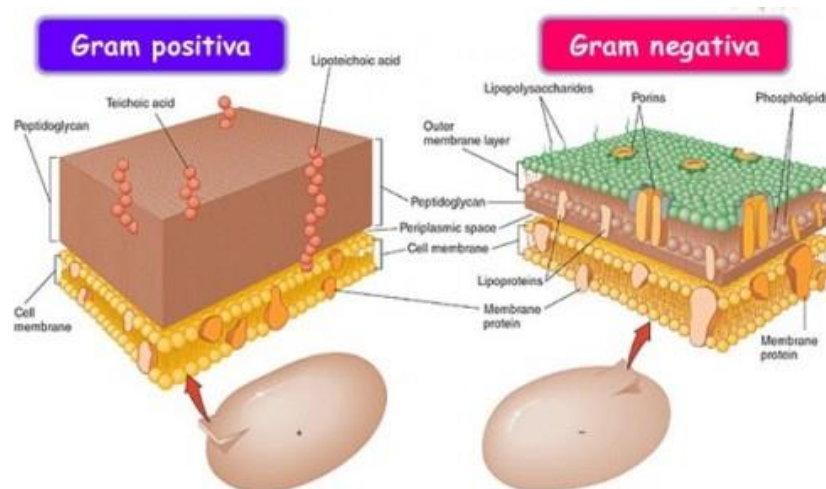


Figura 1: Diferença da membrana de bactérias Gram- positivas e Gram- negativas. **Fonte:** <https://abcdamedicina.com.br/antibacterianos-classes-de-remedios-e-mecanismos-de-acao.html>

As bactérias podem, ainda, apresentar pequenas moléculas circulares do ácido desoxirribonucleico (DNA) extra cromossômico no seu citoplasma, denominadas de plasmídeos, que se caracterizam por ser estruturas que conferem às células propriedades adicionais, de acordo com o seu conteúdo genético. O fato de estes plasmídeos poderem

ser conjugativos, confere-lhes um meio de disseminação horizontal de genes de resistência aos antibióticos, por conjugação, o que é, atualmente frequente (SOUSA et al., 2016).

1.2 Mecanismos de ação dos antibióticos

Os antibióticos são drogas que podem apresentar duas funções distintas, a inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática, e a destruição de uma população bacteriana, por uma ação bactericida. A ação bacteriostática impede o crescimento das bactérias, mantendo o mesmo na fase estacionária (PANKEY; SABATH, 2004). Um droga bactericida atua em processos vitais para a célula levando à morte celular. (HILAL-DANDAN; BRUNTON; GOODMAN, 2014).

Muitos antimicrobianos são obtidos através da própria cultura de microrganismos, e outros são produzidos sinteticamente (CHAN et al., 2000).

Os antibióticos são classificados com base no mecanismo de ação (Figura 2): inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição, dano à membrana plasmática e inibição da síntese de metabólitos.

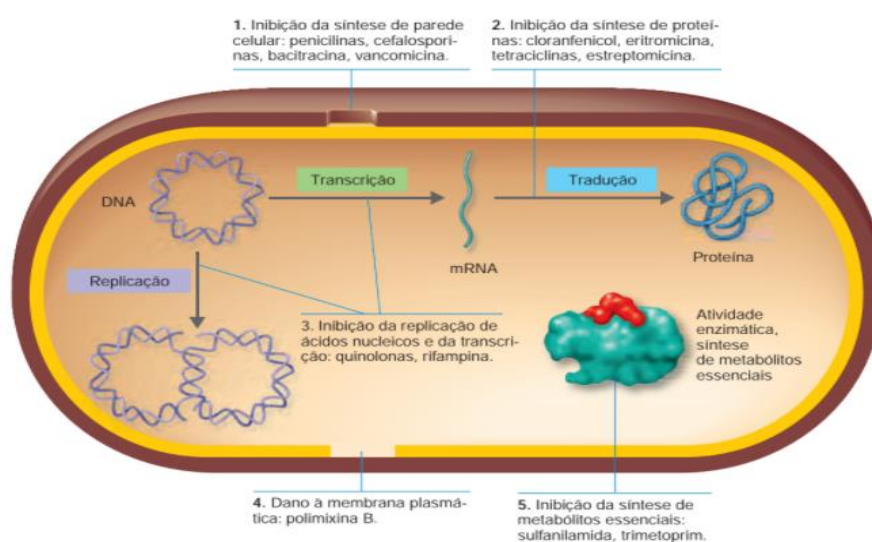


Figura 2: Mecanismos de ação dos antibióticos. Fonte: Tortora et al., 2012.

1.2.1 Inibição da síntese da parede celular

Um dos mecanismos é a inibição da síntese de parede celular, realizado por antibióticos beta-lactâmicos. Esses enfraquecem a parede celular por impedirem a síntese de peptidoglicanos, componente principal da parede célula (TORTORA et al., 2012). O uso desses antimicrobianos é vantajoso pela baixa toxicidade às células humanas, uma vez que estas não possuem parede celular (TORTORA et al., 2012).

Antibióticos β -lactâmicos são comumente usados para o tratamento de uma ampla gama de infecções bacterianas (CROOK; SPRATT, 1998). São definidos estruturalmente pela presença de um anel β -lactâmico central. Eles incluem penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, e estão na base da terapia farmacológica para infecções por organismos Gram-negativos (MURRAY et al., 2004).

1.2.2 Inibição da síntese de proteínas

Os ribossomos bacterianos são organelas celulares constituídas por duas subunidades, 30s e 50s, onde ocorre a ligação dos fármacos de forma a inibir ou modificar a síntese proteica (HILAL-DANDAN; BRUNTON; GOODMAN, 2014). São exemplo de antibióticos que inibem a síntese proteica, os aminoglicosídeos e as tetraciclina (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Os aminoglicosídeos são antibióticos de largo espectro, sendo moderadamente ativos contra bactérias aeróbias Gram-positivas, apresentam extensa atividade sobre bactérias aeróbias Gram-negativas, não apresentando, todavia, atividade sobre bactérias anaeróbias estritas (SOUSA, 2006). Na prática clínica, a gentamicina, a tobramicina e a amicacina são as moléculas usualmente prescritas, enquanto a estreptomicina continua a ser uma ferramenta importante no tratamento de algumas situações de tuberculose, brucelose, tularemia e praga (DURANTE-MANGONI et al., 2009).

As tetraciclina, descobertas na década de 1940, assim como os aminoglicosídeos também são agentes de amplo espectro, exibindo atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, organismos atípicos, como clamídias, micoplasmas e rickettsias, e parasitas protozoários (CHOPRA; ROBERTS, 2001; NELSON et al., 1993). As propriedades antimicrobianas favoráveis desses agentes e a ausência de efeitos colaterais adversos maiores levaram ao seu uso extensivo na terapia de infecções humanas e animais (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

1.2.3 Inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição

Certas drogas antimicrobianas agem inibindo a replicação e transcrição de ácidos nucleicos, como as quinolonas e fluoroquinolonas (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

O uso das quinolonas iniciou-se em 1962, quando Lesher e Cols descreveram o ácido nalidíxico, o precursor das quinolonas. Na década de 70, foram introduzidos na terapêutica dois outros compostos relacionados com o ácido nalidíxico, o ácido oxolínico e a cinoxacina. O interesse por este grupo de quimioterápicos, porém, diminuiu rapidamente em virtude do seu restrito espectro de atividade antibacteriana, do rápido desenvolvimento de resistência e de certas limitações farmacocinéticas (BERGAN, 1988). Em geral, esses antimicrobianos são muito ativos contra patógenos aeróbios Gram-negativos e de ação intermediária contra cocos Gram-positivos (WOLFSON; HOOPER, 1985).

Essa classe de antimicrobianos inibe a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzimas essenciais à sobrevivência bacteriana (ANVISA, 2007). A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (ANVISA, 2007).

1.2.4 Dano à membrana plasmática

Alguns antibióticos, como as polimixinas causam danos à membrana plasmática, induzindo mudanças na permeabilidade da membrana e a perda de metabólitos importantes (TORTORA et al., 2012).

As polimixinas são antibióticos bem estabelecidos que recentemente recuperaram um interesse significativo como consequência do aumento da incidência de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Esse antimicrobiano interagem com a molécula de polissacarídeo da membrana externa das bactérias Gram-negativas, retirando cálcio e magnésio, necessários para a estabilidade da molécula de polissacarídeo. Esse processo é independente da entrada do antimicrobiano na célula bacteriana e resulta em aumento de permeabilidade da membrana com rápida perda de conteúdo celular e morte da bactéria (ANVISA, 2007).

O uso clínico de polimixinas foi abandonado na década de 1960 por causa da nefrotoxicidade e porque drogas mais toleradas pertencentes a outras classes de antibióticos foram introduzidas (DOAN, 2006). Atualmente, devido à disseminação global de cepas bacterianas Gram-negativas extremamente resistentes aos medicamentos, as polimixinas ressurgiram como drogas de última linha contra essas cepas (TUMBARELLO; LOSITO; HELEN, 2018).

1.2.5 Inibição da síntese de metabólitos essenciais

A inibição da síntese de metabólitos essenciais para a célula bacteriana é ocasionada por uma substância que inibe competitivamente o sítio ativo na enzima, por se assemelhar com seu substrato normal. Drogas sulfa como a sulfanilamida são antimetabólitos que possuem este mecanismo de ação (TORTORA et al., 2012).

As sulfonamidas foram um dos primeiros antibióticos a serem utilizados em doenças infecciosas. Estes possuem um espectro de ação bastante amplo, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HILAL-DANDAN; BRUNTON; GOODMAN, 2014). No entanto

nos últimos anos surgiu o desenvolvimento de estirpes resistentes (NEU; GOOTZ, 1996).

1.3 Mecanismos de resistência bacteriana

O surgimento de resistência entre os patógenos bacterianos mais importantes é reconhecido como uma grande ameaça à saúde pública que afeta seres humanos em todo o mundo (MUNITA; ARIAS, 2016).

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos do microrganismo ou adquiridos (LORIAN, 2005). A característica de resistência a um antibiótico pode ser adquirida através da transferência horizontal de novos genes, que são carregados por plasmídeos ou transposons, recombinação com um DNA externo no cromossomo da bactéria, ou pela ocorrência de mutações espontâneas, onde genes localizados nos cromossomos são transmitidos verticalmente ao passo que as bactérias se replicam (MARTINEZ; BAQUERO, 2000).

As bactérias são consideradas multirresistentes quando observados critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (SCIH-HUM, 2017). Segundo Magiorakos et al. (2012) existem três terminologias para multiressistência. Podem ser definidas como: MDR (*"Multidrug-resistant"*), quando são resistentes a um ou mais antimicrobianos de três ou mais categorias de antimicrobianos testadas; XDR (*"Extensively drug-resistant"*), quando apresentam resistência a um ou mais antimicrobianos em quase todas as categorias; PDR (*"Pandrug-resistant"*), quando apresentam resistência a todos os antimicrobianos testados.

Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos (Figura 3) em bactérias que são: alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula; hiperexpressão de bombas de efluxo que excretam o antibiótico da célula; alteração do sítio alvo – *"penicillin-binding proteins"* (PBP) que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e produção de enzimas (beta-lactamases) que degradam ou inativam o antibiótico (TENOVER, 2001).

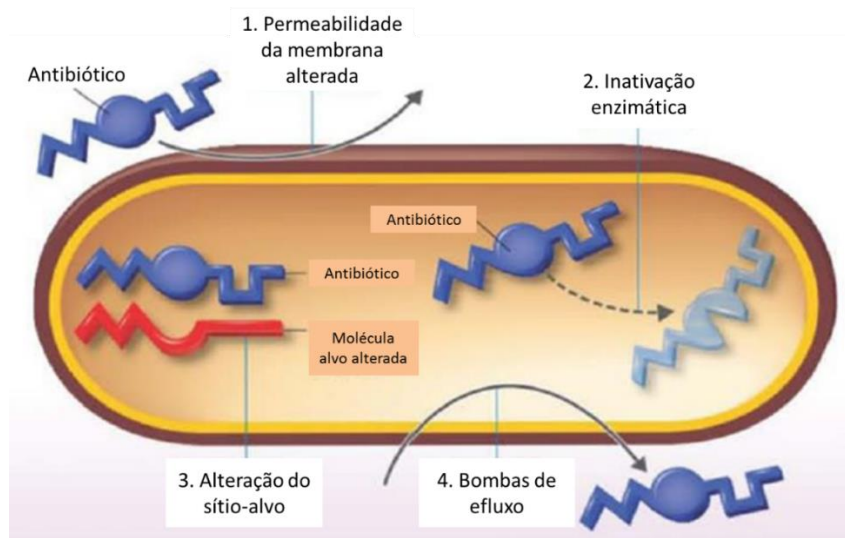


Figura 3: Mecanismos de resistência aos antibióticos. (1) Alteração da permeabilidade da membrana. (2) Inativação enzimática. (3) Alteração no sítio-alvo do antibiótico. (4) Bombas de efluxo.

1.3.1 Bombas de efluxo

Um dos mecanismos primários para a resistência a múltiplas drogas em bactérias Gram-negativas é a superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas, expelir antibióticos absorvidos pelas bactérias (LEVY; MARSHALL, 2004). O efluxo de pequenas moléculas consiste num mecanismo não seletivo, podendo defender células bacterianas de vários compostos tóxicos, promovendo então uma resistência inata aos antimicrobianos (FISHER; MEROUEH; MOBASHERY, 2005).

A maioria deles são transportadores de múltiplas drogas que são capazes de bombear uma ampla gama de antibióticos - macrolídeos, tetraciclina e fluorquinolonas - e, portanto, contribuem significativamente para organismos resistentes a múltiplas drogas (DŽIDIC, 2008).

1.3.2 Redução da permeabilidade da membrana externa

Em comparação com espécies Gram-positivas, bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos, pois sua membrana externa forma uma barreira de permeabilidade (KOJIMA; NIKAIDO, 2013; VARGIU; NIKAIDO, 2012).

Nesse tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico pode dever-se às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas. (RYAN & RAY).

No entanto, dados recentes mostraram que em *Enterobacteriaceae* reduções na expressão da porina contribuem significativamente para a resistência a novos fármacos, como os carbapenêmicos e as cefalosporinas, aos quais a resistência é geralmente mediada pela degradação enzimática (TAMBER; HANCOCK, 2003). Por exemplo, resistência clinicamente relevante aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* pode ocorrer na ausência de produção de enzimas que degradam o antimicrobiano se mutações reduzirem a produção de porina (BAROUD et al., 2013; WOZNIAK et al., 2010).

1.3.3 Alteração do sítio alvo

Segundo Munita (2016), outra estratégia comum para as bactérias desenvolverem resistência antimicrobiana é evitar a ação do antibiótico ao interferir com o local alvo. Para conseguir isso, as bactérias desenvolveram diferentes táticas, incluindo a proteção do alvo (evitando que o antibiótico alcance seu local de ligação) e modificações do local alvo que resultam em diminuição da afinidade pela molécula de antibiótico.

Durante a progressão da infecção, muitas vezes há populações grandes e diversificadas de patógenos, e se ocorrer uma única mutação pontual no gene que codifica um alvo, pode conferir resistência ao antibiótico, cepas com essa mutação podem então proliferar (BILLAL et al., 2011).

A proteção por modificação do alvo também pode ser um meio eficaz de resistência a antibióticos que não requerem uma mudança mutacional nos genes que codificam as moléculas alvo. Um exemplo de proteção do alvo é a adição de um grupo químico que

também pode prevenir a ligação do antibiótico sem alterar a sequência primária da proteína do alvo, que retém sua atividade (BLAIR et al., 2015).

1.3.4 Inativação enzimática - Produção de betalactamases

Um dos mais efetivos mecanismos conhecidos das bactérias Gram-negativas é a produção de beta-lactamases que são enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo assim a síntese da parede celular bacteriana (LAGATOLLA et al., 2004; LIVERMORE, 1995).

As enzimas beta-lactamases nas bactérias Gram-negativas se acumulam no espaço periplasmático, entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, impedindo que os beta-lactâmicos atravessem essa região para atingir seus receptores na membrana interna (SOARES et al., 2012).

A classificação das beta-lactamases funciona baseado em dois esquemas: o de Ambler e o de Bush-Medeiros-Jacoby (SOARES et al., 2012). O primeiro Ambler (Figura 4) classifica quanto a sequência de aminoácidos e local ativo da enzima em quatro classes: A, B, C e D. As classes A, C e D têm um resíduo serina no local ativo da enzima, enquanto as enzimas da classe B possuem um resíduo de cisteína.

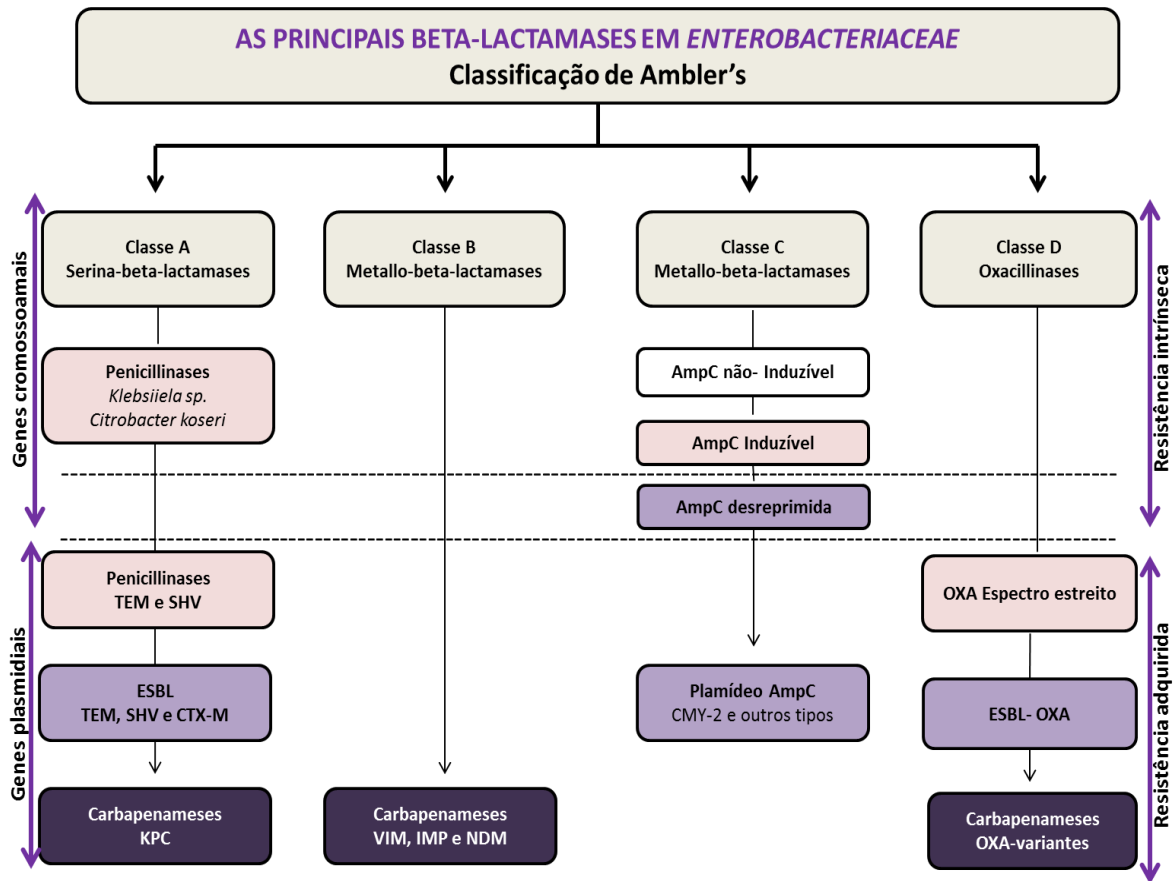


Figura 4: Classificação de Ambler's das enzimas beta-lactamases. Fonte: (RUPPÉ et al., 2015).

Já o segundo esquema de Bush-Medeiros-Jacoby (Tabela 1) é baseado em similaridades funcionais, ou seja, atividade das enzimas em relação ao substrato e se elas são inibidas pelo ácido clavulânico ou pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SOARES et al., 2012).

Tabela 1. Classificação de Bush-Medeiros-Jacoby das beta-lactamases.

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ϵ	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	Nlb	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2 ^a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- β -lactam	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

Por sua vez, os genes que codificam para a produção de beta-lactamases podem estar localizados em cromossomos ou plasmídeos, considerando que as bactérias podem possuir uma beta-lactamase cromossômica e passar a expressar outra beta-lactamase (chamada de beta-lactamase secundária), devido à aquisição de genes codificados em plasmídeos ou transposons (LIVERMORE, 1995a).

- **Hiperprodução de AmpC**

São produzidas em algum grau por todas as bactérias Gram-negativas (SOARES et al., 2012). As β -lactamases AmpC são cefalosporinases que hidrolisam as cefalosporinas e conferem resistência ao ácido clavulânico, drogas β -lactâmicas como a ceftazidima, a ceftazidima e a maioria das penicilinas (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000).

O gene da β -lactamase AmpC foi relatado em cromossomos em *Enterobacter*, *Shigella*, *Morganella morganii* e *E. coli* (BAUERNFEIND et al., 1999). Curiosamente, o gene da β -lactamase AmpC também tem sido encontrado em plasmídeos e são altamente transmissível em *K. pneumoniae* e *E. coli* (LIVERMORE, 1995a).

- **Betalactamase de espectro ampliado ou ESBL (*extended spectrum betalactamase*)**

Desde o final da década de 1980, as infecções causadas por organismos produtores de β -lactamases (ESBL) foram relatados no mundo todo (BELL et al., 2002). As ESBLs são o tipo de enzimas que têm a capacidade de hidrolisar antibióticos de amplo espectro (BOUCHILLON et al., 2004).

As cepas portadoras de ESBLs são resistentes às penicilinas, as cefalosporinas de 1ª a 4ª geração e aos monobactâmicos (OPLUSTIL et al., 2010).

São enzimas mediadas por genes plasmidiais- como por exemplo: TEM-1 e SHV-1 (SOARES et al., 2012), muito frequentes em enterobactérias (OPLUSTIL et al., 2010). Existem centenas de variantes dos genes CTX-M, outro gene que codificam ESBLs, que são

notáveis por sua maior atividade contra o antibiótico cefotaxima. Esses genes são classificados em diferentes subgrupos, que resultaram da evasão de genes do cromossomo (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008).

- **Carbapenemases**

Estas são definidas como as beta-lactamases que hidrolisam imipenem e/ou meropenem (SOARES et al., 2012). Essas enzimas dividem-se em 03 classes de Ambler de beta-lactamases: A, B e D que incluem a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), 04 serina carbapenemases (SME, NMC-A, IMI, e GES) e várias metalo-beta-lactamases (IMI, VIM) (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). A classificação de Ambler é baseado na sequência de aminoácidos e local ativo da enzima em quatro classes: A, B, C e D, pois as classes A, C e D têm um resíduo serina no local ativo da enzima, enquanto as enzimas da classe B possuem um resíduo de cisteína (SOARES et al., 2012).

- **KPC Carbapenemases:**

Esses agentes ocorrem mais comumente na classe A de carbapenemases (YIGIT et al., 2001). Embora tenha sido descrito KPC 1 a 8, o tipo 1 e 2 são consideradas idênticas, sendo o restante variantes do gene bla_{KPC} em plasmídeos conjugativos que carregam outros marcadores de resistência tais como resistência as fluorquinolonas e aminoglicosídeos (OVERTURF, 2010). É importante considerar que apesar a enzima KPC ter sido encontrada frequentemente em *K. pneumoniae*, outras espécies como *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens* (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009), também produzem essa enzima.

- **Serina Carabapenemases:**

A classe A das serina carbapenemases são as enzimas cromossomais que incluem: SME, IMI e NMC-A, e a enzima plasmidial, GES betalactamase (QUEENAN; BUSH, 2007).

As enzimas SME e GES estão presentes em isolados de *S. marcescens*, sendo esta última também encontrada dentro de integrons e plasmídeos de *Pseudomonas aeruginosa* (OVERTURF, 2010).

- **Classe B Metallobetalactamase:**

Pertencem a classe B de Ambler, caracterizada por amplo espectro de atividade contra os carbapenêmicos, penicilinas e cefalosporinas de espectro estendido, exceto aztreonam (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009; QUEENAN; BUSH, 2007). Essas enzimas requerem zinco como cofator e são inibidas por EDTA, um quelante de íons cátions divalente. Essas enzimas ocorrem em múltiplos gêneros de bactérias gram-negativas, incluindo as enterobactérias e não –fermentadores (OVERTURF, 2010). O tipo VIM e IMP são as metalo-beta-lactamases mais comuns, considerando que a MBL VIM compõe uma família de 14 enzimas, mas a VIM-2 predomina na maioria dos surtos (OVERTURF, 2010).

1.4 Detecção de carbapenemases pelos laboratórios

A detecção de bactérias produtoras de KPC tem sido um desafio para os laboratórios devido a expressão de resistência heterogênea frente aos antimicrobianos beta-lactâmicos (BRATU et al., 2005). Tanto os métodos automatizados quanto o teste de suscetibilidade de difusão em ágar mostram algumas inconsistências na detecção de KPC, que pode ser influência dos carbapenêmicos utilizados no ensaio (BRATU et al., 2005). Diante disso é indicado utilizar o teste de Hodge para confirmação (LEE et al., 2001) que consiste num teste fenotípico que são menos reproduzíveis e possuem menos poder de discriminação que o método genotípico, já que a expressão do caráter fenotípico é resultado da interação do genotípico mais influência ambiental (CUENCA, 2004).

As técnicas de tipificação baseadas na amplificação de ácidos nucléicos mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) se fundamenta no mesmo princípio comum: a amplificação de genes, o sequenciamento de DNA polimórficos e a separação eletroforética

dos produtos amplificados (OLIVE; BEAN, 1999). Essas técnicas podem ser utilizadas em conjunto com outros métodos moleculares, tais como: restrição enzimática, hibridização de sondas específicas e sequenciamento de ácidos nucléicos (CUENCA, 2004). Dessa forma as reações em cadeia de polimerase (PCR) e demais ensaios baseados, têm sido desenvolvidos para detectar a resistência aos carbapenêmicos KPC mediados. A PCR real-time (RT-PCR) tem sido utilizada na detecção rápida de colonização/infecção por enterobactérias produtoras de KPC em diversos tipos de amostras e isolados clínicos, demonstrando boa sensibilidade e especificidade com valores positivos e negativos favoráveis (COLE et al., 2009).

As técnicas moleculares têm sido úteis na discriminação dos isolados de patógenos (GARAIZAR et al., 2000), auxiliando o estudo epidemiológico clonal das enfermidades infecciosas, cuja finalidade é determinar a relação clonal que existe entre vários isolados da mesma espécie (CUENCA, 2004). Essas informações são úteis nas investigações de surtos epidêmicos causados por isolados multirresistentes, pois permite determinar o número de clones circulantes, identificar a fonte de contaminação, o reservatório e veículo de transmissão, além de avaliar a eficácia das medidas de controle para evitar a disseminação de clones e diferenciar entre infecção e recidivas (MASLOW; MULLIGAN; ARBEIT, 1993).

Deste modo, considerando que as bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e resistentes a multidrogas (MDR) constituem um grave problema mundial, e que o uso generalizado de antibióticos juntamente com a transmissibilidade de determinantes de resistência mediada por plasmídeos, transposons e cassetes de genes em integrons são fatores que contribuem para o aumento da resistência aos antibióticos em bactérias potencialmente patogênicas, o presente trabalho determinou os perfis de resistência aos antimicrobianos, a presença de genes codificantes para carbapenemases, sua transmissibilidade e a diversidade gênica dos isolados de *Serratia marcescens*.

1.5 INTRODUÇÃO

1.5.1 *Serratia marcescens*

As espécies de *Serratia* são onipresentes no meio ambiente e são encontrados na água e no solo, bem como associados a plantas, insetos, humanos e outros animais. São bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e compreende pelo menos 14 espécies com duas subespécies (MAHLEN, 2011). Entre estas espécies de *Serratia*, *S. marcescens* é a mais comumente associada com infecções humanas. Originalmente considerado não patogênico, agora é reconhecido como um importante nosocômio patógeno capaz de causar infecções do trato urinário (MAKI; GOLDMAN; RHAME, 1973; OKUDA et al., 1984), corrente sanguínea infecções, incluindo endocardite (KÖRNER et al., 1994), e muitos outros tipos de infecções (SUGUMAR et al., 2014; YU et al., 2003).

As infecções causadas por *Serratia marcescens* têm sido reportadas com aumento de frequência desde 1960 (MCCORMACK; KUNIN, 1966), apesar do conhecimento limitado sobre a capacidade patogênica da bactéria (SAMONIS et al., 2017), há registros de relatos de investigação e controle de surtos de infecções de corrente sanguínea por *S. marcescens* (IOSIFIDIS et al., 2012). Deste modo, tem sido relatado que a *Serratia marcescens* é um patógeno com grande impacto sobre a saúde pública (STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003), além da importante característica de ser um patógeno nosocomial com resistência intrínseca e adquirida aos agentes antimicrobianos (YANG et al., 2012).

Muitos isolados clínicos desse microrganismo carregam determinantes genéticos cromossomal e plasmídeos especificamente resistentes a uma ampla gama de antibióticos (MAHLEN, 2011), incluindo beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) ou metalo-beta-lactamases (MBL). Como outras *Enterobacteriaceae*, a produção de beta-lactamases que inativam certos antimicrobianos beta-lactâmicos, é o mais comum mecanismo de resistência nas *S. marcescens* (YANG et al., 2012). Estudos em hospitais da Polônia (NAUMIUK et al., 2004) e Taiwan (YANG et al., 2012) demonstraram que 19% e 12% dos isolados de *S.*

marcescens, respectivamente, produziram ESBL (NAUMIUK et al., 2004). Com relação ao MBL, a produção desta enzima é clinicamente mais problemática, pois provoca um alto nível de resistência a uma ampla gama de beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (IGUCHI et al., 2014). Uma enzima MBL representativa (IMP) foi primeiramente descrita em 1991, no Japão (OSANO et al., 1994). Desde então, vários tipos de MBL têm sido identificados em isolados de *S. marcescens* (WACHINO et al., 2011), incluindo linhagens causadoras de surtos (NASTRO et al., 2013). Com relação aos fatores de virulência de *S. marcescens*, apesar de alguns já terem sido identificados, incluindo hemolisina (SHIMUTA et al., 2009), proteases (LYERLY et al., 1981), lipopolisacarídeos (LPS) (MAKIMURA et al., 2007), fimbrias (PARMENT et al., 1992) e siderófilos (LÉTOFFÉ; GHIGO; WANDERSMAN, 1994), a patogenicidade e a plasticidade genômica dessas espécies não são ainda totalmente compreendidas (IGUCHI et al., 2014)

Estudos têm identificado genes cromossomais para resistência aos antimicrobianos em isolados de *S. marcescens* para síntese de bombas de efluxo, sendo alguns destes espécie-específicos (IGUCHI et al., 2014). Em adição, a presença de beta-lactamase AmpC, duas aminoglicosídeos acetiltransferases e uma enzima que inativa fosfomicina (FoSA) têm sido encontrados em genes cromossomais em diferentes linhagens (IGUCHI et al., 2014). Nesse mesmo estudo, um isolado de *S. marcescens* apresentou altos níveis de resistência a múltiplas drogas devido a presença do plasmídeo (pSMC1) o qual codifica para a síntese de metalo-beta-lactamase (MBL) e para vários outros determinantes de resistência (IGUCHI et al., 2014).

2. OBJETIVO GERAL

Determinar os perfis fenotípicos da susceptibilidade antimicrobiana, avaliar a presença de alguns genes de resistência e analisar a transmissibilidade e diversidade clonal de *Serratia marcescens*, isoladas em hospital de urgência, no período de 2014 e 2015.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos através de Vitek-2 automated system (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA);
- Identificar a presença de genes de penicilinases, ESBL e carbapenamase: A, B e D (segundo Ambler) que incluem as serina beta-lactamases, metalo-beta-lactamases e oxacilinases;
- Identificar a presença dos genes de resistência aos antibióticos das classes das glicilciclinas e colistina.
- Analisar a similaridade genética pela técnica de ERIC-PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Cinquenta e quatro isolados clínicos de *Serratia marcescens* foram coletados de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs) de um hospital terciário, localizado na cidade de Palmas, estado do Tocantins, que pertence à região norte do Brasil. As cepas foram isoladas a partir de aspirado traqueal, sangue, swab retal, ferida, ponta de catéter, dreno, escarro, urina, lesão e swab de lesão. Todas as bactérias foram armazenadas a -80 °C em caldo de infusão de cérebro e coração com 15% v/v de glicerol. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (nº 1.088.936) foi obtida antes da realização do estudo. Todos os métodos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos exigidos.

3.2 Isolamento das Bactérias

As amostras biológicas foram inicialmente analisadas quanto a identificação da espécie e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos pelo método disco-difusão em ágar Mueller Hinton (Kirby-Bauer) no laboratório de microbiologia do Hospital Geral de Palmas (Tocantins, Brasil). Os isolados bacterianos que apresentaram resistência a todos os carbapenêmicos foram enviados ao laboratório de Bacteriologia/Biologia Médica do Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Tocantins (LACEN-TO) para serem novamente processados por meio da ressuspensão bacteriana a partir da seleção de uma colônia mais próxima do disco de meropenem para confirmação quanto à identificação do gênero, espécie e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos por meio do método de automação Vitek-2 automated system (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA). Esses procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos da instituição que são periodicamente revisados e atualizados de acordo com as orientações abaixo.

3.3 Identificação bacteriana e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A identificação bacteriana e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foram feitos

após o preparo de uma suspensão bacteriana na turbidez 0,5 da escala de MacFarland. A amostra foi aplicada nos cartões GN 21341 (GN Test Kit VTK2), de identificação da espécie bacteriana, e AST N239 para o perfil de suscetibilidade, e os cartões foram lidos no equipamento Vitek-2 automated system (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA). Todas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram conferidas, analisadas e liberadas de acordo com as recomendações padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI- USA) de 2014. Foram consideradas também as orientações técnicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, obedecendo o fluxo existente pelo Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública - Portaria 2031/MS/GM, 23 de setembro de 2004, inseridos no Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar – Portaria 232/98. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) indicativas de resistência para as classes de carbapenêmicos, concomitantes ou não as outras classes de antimicrobianos resistentes (fluroquinolonas e aminoglicosídeos) foram indicativas para a investigação fenotípica de carbapenemases.

Todas as *Serratia marcescens* foram testadas quanto à sua resistência contra os seguintes 17 antibióticos: Amicacina (AMK), Ampicilina (AMP), Ampicilina-sulbactam (SAM), Cefepima (FEP), Cefuroxima- axetil (CXM), Cefuroxima- sódica (CXM-S), Cefoxitina (FOX), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Colistina (CST), Ertapenem (ERP), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Piperacilina-tazobactam (TZP) e Tigeciclina (TGC). A suscetibilidade à tigeciclina e à colistina foi interpretada usando pontos de quebra propostos pelo Comitê Europeu para o Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Os testes presuntivos utilizados para determinar a produção de carbapenemase foram: teste de Hodge modificado e Teste para Metallo-beta-lactamase, conforme as orientações do CLSI (CLSI, 2014) e demais autores (OKOCHE et al., 2015; NORDMANN et al., 2011; MIRIAGOU et al., 2010).

3.4 Análise fenotípica

3.4.1 Teste de Hodge

Foi separado um tubo de ensaio com uma suspensão “1” da cepa de *E.coli* ATCC 25922 compatível com a escala de MacFarland 0,5. Em outro tubo foi realizada uma nova suspensão “2” através da transferência de 280 μ L da suspensão “1” + 280 mL de salina. Esta é a suspensão de *Escherichia coli* padrão para semear em estrias por toda a placa de ágar Mueller Hinton (90 mm). Em seguida, foi colocado um disco de meropenem no centro da placa e foi coletado 3 a 5 colônias das cepas para análise (testes) com um *swab* ou alça estéril, em linha do disco para fora (aproximadamente 2 a 2,5 centímetros). Foi realizado junto com os testes o controle negativo com a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 170 e controle positivo com a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705. A placa foi incubada por 16 a 20 horas 35 \pm 2°C (CLSI, 2014).

A interpretação dos resultados foi realizada através da observação visual das colônias de *Escherichia coli* próximas à estria. Foi positivo para o teste de Hodge com a afirmação de provável produtor de carbapenemase, se houve a forma de invaginação do crescimento de *E.coli* próxima a estria. Por sua vez, foi negativo para o teste de Hodge se houve inalteração do halo de inibição da *E. coli*.

3.4.2 Teste para Metallo-beta-lactamase

Este foi realizado pela semeadura em placa contendo o meio Mueller Hinton (90mm) com uma suspensão 0,5 da escala de MacFarland do isolado a ser testado. Após a semeadura pela técnica de varredura, foram colocados um disco de imipenem (IMP) e outro de meropenem (MEM) no centro da placa com distância igual a 30 mm. Foi colocado perto de cada disco de antimicrobiano dois discos de papel filtro, um com 10 mm e outro com 15 mm de distância. Foi pipetado 5 μ L de uma solução de EDTA 0,2M em cada disco de papel filtro e levados para incubar em estufa bacteriológica por 16 a 20 horas na temperatura 35 \pm 2°C. O controle positivo foi a *K. pneumoniae* de isolado clínico, já o controle negativo foi

a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (Zanol et al., 2010; Arakawa et al., 2000).

A interpretação foi positiva para o teste de metalo-beta-lactamase com a afirmação de provável produtor de carbapenamase, se houvesse a deformação do halo ao redor dos antimicrobianos (IMP) e (MER). Foi negativo para o teste na ausência da deformação do halo.

3.5 Análises Moleculares

3.5.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da cultura usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega). A concentração do extrato de DNA e pureza foi determinada medindo a absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (NanoVue Plus - GE Healthcare Life Sciences). A integridade do DNA genômico foi testada por extração de DNA em gel de agarose a 1,0% p/v por eletroforese. Esses extratos brutos de DNA foram congelados a -20 °C.

3.5.2 Detecção de genes de resistência a múltiplas drogas

A detecção de genes de resistência foi realizada para a bactéria *Serratia marcescens* por PCR e suas identidades foram confirmadas por sequenciamento. Os isolados foram selecionados por amplificação por PCR usando primers específicos (Tabela 2) para a detecção de genes codificadores de beta-lactamase de espectro estendido (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}), de genes codificadores para carbapenemas (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}) e gene de resistência à colistina (*mcr-1*).

Tabela 2. Sequências dos primers usados para detecção dos genes de resistência de *S. marcescens*.

Genes	Sequências (5'-3'), F/R	TM (°C)	Tamanho do amplicon (bp)	Referências
<i>bla</i> _{KPC}	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	61,3	797	POIREL et al., 2011
<i>bla</i> _{TEM}	TGCGGTATTATCCCGTGTTG TCGTCGTTTGGTATGGCTTC	63	296	XIONG et al., 2007
<i>bla</i> _{CTX-M-1 grupo, (incluindo <i>bla</i>_{CTX-M-1, 3, 10, 11 and 12})}	ACAGCGATAACGTGGCGATG TCGCCAATGCTTTACCCAG	64	216	XIONG et al., 2007
<i>bla</i> _{SHV} variantes	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC ATCCCGCAGATAAATCACCCAC	55,6	712	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-1, 4 and 30}	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	63	563	DALLENNE et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-48}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	55	438	POIREL et al., 2011
<i>bla</i> _{IMP}	CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC ACAACCAGTTTTGCCTTACC	55	587	MARTINS et al., 2007
<i>bla</i> _{VIM}	AAAGTTATGCCGCACTCACC TGCAACTTCATGTTATGCCG	55	865	YAN; WESTFALL; ORLEAN, 2001
<i>bla</i> _{NDM}	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	60	782	DOYLE et al., 2012
<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTT CTTGGTCGGTCTGTAGGG	51,6	309	LIU et al., 2016

3.6 Tipagem Molecular e Análises Epidemiológicas

3.6.1 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) para *Serratia marcescens*

A análise de Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) foi realizada para avaliar a similaridade genética entre os isolados bacterianos. Reações ERIC-PCR foram executadas como descrito por Versalovic et al. (1994), utilizando os iniciadores ERIC1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3) e ERIC2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Todas as amplificações foram realizadas em um volume total de 50 µL, utilizando a enzima DNA polimerase TaKaRa Ex Taq® (Takara Bio EUA, Inc., Mountain View, CA, EUA), padronizando a quantidade de 100 ng de DNA para cada isolado. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de

agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio utilizando radiação UV para visualização das bandas.

A análise do perfil de bandas foi realizada utilizando o programa BioNumerics versão 5.1 (AppliedMaths, Keijkstraat, Bélgica) para construção do dendrograma de similaridade pelo método de UPGMA, coeficiente de similaridade de Dice e tolerância de posição de banda de 1%. Apenas bandas representando amplicons entre 300 e 3000 pb foram consideradas para esta análise. Os ensaios ERIC-PCR foram realizados em triplicata para garantir a reprodutibilidade das bandas amplificadas e confiabilidade dos resultados.

3.7 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher ($p \leq 0,05$) para *Serratia marcescens*.

4. RESULTADOS

4.1 Características gerais

Entre fevereiro de 2014 e junho de 2015, um total de 54 cepas de *S. marcescens* foram isoladas de amostras coletadas de pacientes de UTI de um hospital terciário localizado na capital Palmas, Estado do Tocantins, Brasil.

As amostras foram isoladas dos seguintes locais: aspirado traqueal (33%, n=18) com maior número de coletas, sangue (24%, n=13), swab retal (22%, n=12), ferida (6%, n=3), ponta de catéter (4%, n= 2), dreno (4%, n= 2), escarro (2%, n=1), urina (2%, n=1), lesão (2%, n=1) e swab de lesão (2%, n=1), como mostra a Figura 5A. As amostras foram identificadas por números.

A média de idade dos pacientes foi de 51 anos variando de 0 a 93 anos, havendo maior quantidade de isolados no intervalo 60 ou mais, e o gênero predominante foi o masculino, como mostrado na Figura 5B.

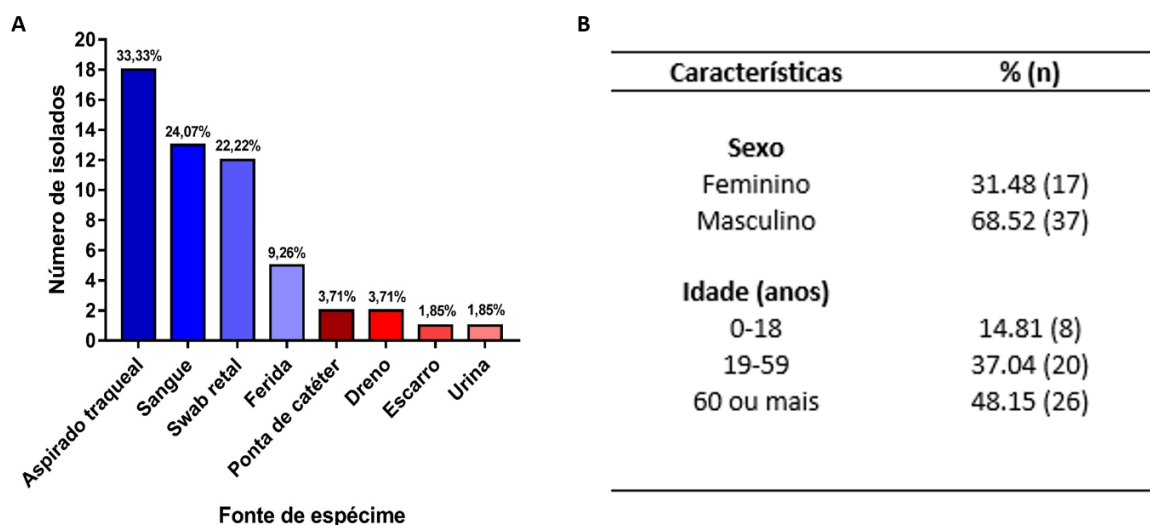


Figura 5: (A) Número de amostras de *S. marcescens* por sítio de isolamento. (B) Características dos pacientes de *S. marcescens*.

4.2 Análise estatística

Conforme mostrado na Tabela 3, as análises estatísticas mostraram que não houve diferenças significativas nos perfis de resistência aos antibióticos distribuídos por idade e sexo.

Tabela 3: Perfis antimicrobianos distribuídos por idade e sexo em *S. marcescens*.

Resistência antibiótico/ Idade (anos)	0-18 (1)		19-59 (2)		>60 (3)		p-value 1/2	p-value 1/3	p-value 2/3
	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível			
Amicacina	1	7	4	16	1	25	1	0.4207	0.1512
Gentamicina	2	6	5	15	1	25	1	0.131	0.07175
Ciprofloxacina	1	7	5	15	4	22	0.6399	1	0.4725
Tigeciclina	6	2	11	9	13	13	0.4188	0.2569	0.7739
Colistina	8	0	18	2	26	0	1	1	0.1836

Resistência antibiótico/ Sexo	Masculino		Feminino		p-value
	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	
Amicacina	5	32	1	16	0.6522
Gentamicina	7	30	1	16	0.4112
Ciprofloxacina	8	29	2	15	0.4762
Tigeciclina	18	19	12	5	0.1534
Colistina	35	2	17	0	1

4.3 Análise fenotípica

Analisando o perfil de resistência à classe dos antibióticos beta-lactâmicos, polimixina (colistina) e gliciliciclina (tigeciclina), em relação ao sexo, os isolados bacterianos pertencentes a pacientes do sexo masculino apresentaram uma frequência de resistência maior. Quanto à resistência aos beta-lactâmicos 37 (69%) bactérias foram isoladas de pacientes do sexo masculino e 17 (31%) bactérias de pacientes do sexo feminino (Figura 6A). Com relação ao antibiótico colistina, 52 (96%) isolados foram resistentes, sendo 17 (31%) pertencente ao sexo feminino e 35 (65%) pertencente ao sexo masculino. Quanto ao antibiótico tigeciclina, 50 (93%) isolados foram resistentes, sendo 17 (31%) do sexo feminino e 33 (61%) do sexo masculino.

De acordo com a Figura 6B, os isolados mostraram diferentes graus de resistência à outras classes de antibióticos em relação ao sexo, no entanto, o sexo masculino ainda permaneceu o mais frequente. Para o antibiótico amicacina, somente 8 (15%) dos isolados foram resistentes, 1 (2%) pertence ao sexo feminino e 7 (13%) ao sexo masculino, quanto ao antibiótico ciprofloxacina, 10 (19%) dos isolados foram resistentes, sendo 2 (4%) do sexo feminino e 8 (15%) do sexo masculino. Para o antibiótico gentamicina, 10 (19%) foram resistentes, sendo 1 (2%) do sexo feminino e 9 (17%) do sexo masculino.

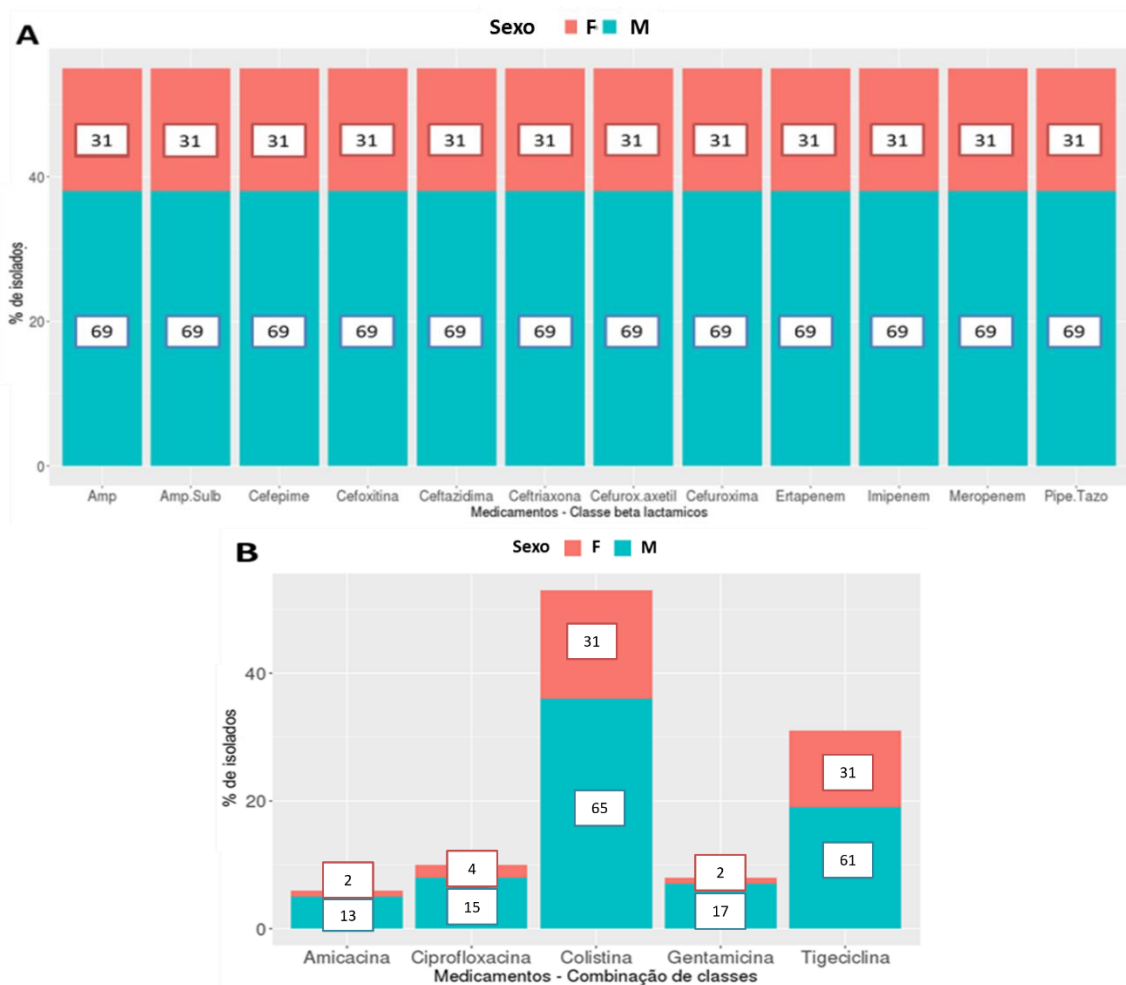


Figura 6: (A) Perfil de resistência à classe dos antibióticos beta- lactâmicos em relação ao sexo em *S. marcescens*. (B) Perfil de resistência aos demais antibióticos analisados em relação ao sexo em *S. marcescens*.

Alguns dos isolados de *Serratia marcescens* (24%, 13/54) foram classificados como multidroga resistentes (MDR), ou seja, apresentaram resistência a pelo menos três ou mais classes dos antibióticos analisados. Como podemos observar na Figura 7, a classe de

antimicrobianos que teve maior quantidade de isolados de *S. marcescens* resistentes foram beta-lactâmicos, polimixina (colistina) e glicilciclina (tetraciclina), seguido de quinolona (ciprofloxacina) e os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina).

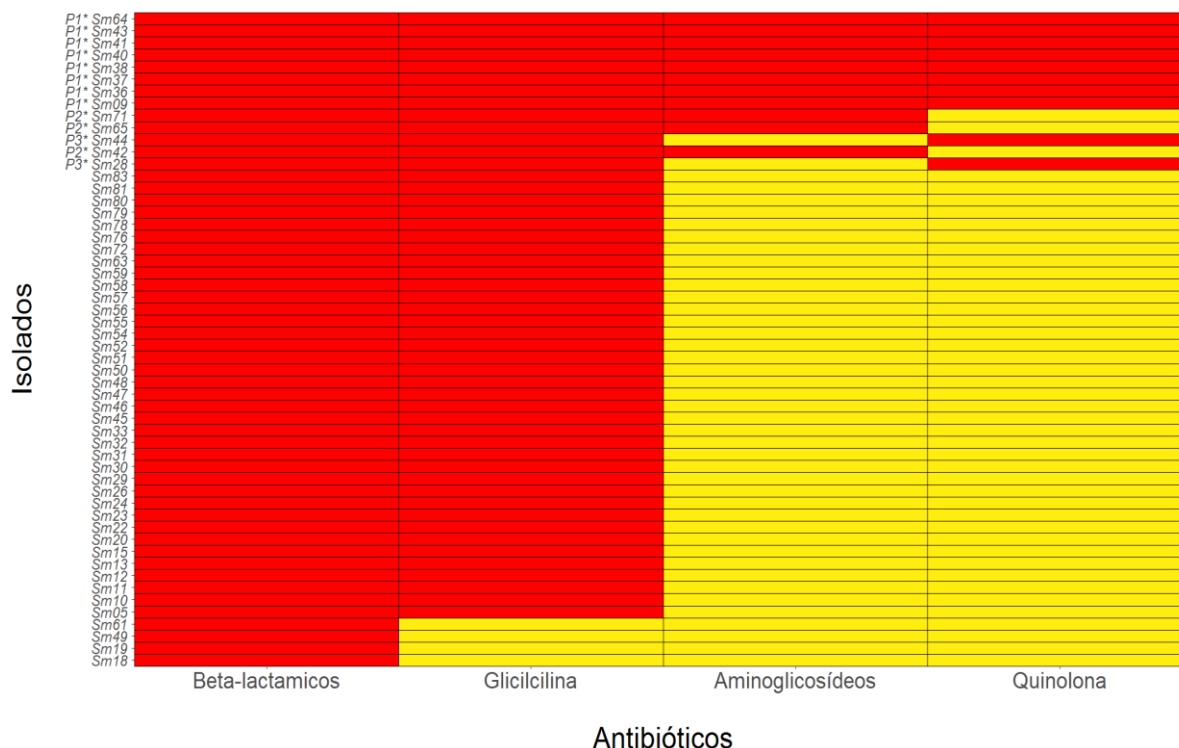


Figura 7: Heatmap dos isolados classificados como multidroga-resistente (MDR)- *P. Em vermelho estão os isolados resistentes e em amarelo os suscetíveis as classes dos antibióticos analisados. A classe de aminoglicosídeos corresponderam aos antibióticos amicacina e gentamicina. Padrões de resistência-P1: Resistência aos beta-lactâmicos, glicilcilina, aminoglicosídeos e quinolona; P2: Resistência aos beta-lactâmicos, glicilcilina e aminoglicosídeos; P3: beta-lactâmicos, glicilcilina e quinolona.

O perfil de resistência das bactérias foi testado contra cinco classes de antibióticos, β-lactâmicos, aminoglicosídeo, quinolona, glicilcilina, polimixina; totalizando 17 antibióticos analisados (Figura 8). As 54 (100%) cepas de *S. marcescens* foram resistentes aos 11 β-lactâmicos testados (AMP, SAM, TZP, CXM-S, CXM, FOX, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM). Além disso, os isolados mostraram diferentes graus de resistência a outros antibióticos como, amicacina da classe dos aminoglicosídeos (n = 8/54, 15%), gentamicina também da classe dos aminoglicosídeos (n = 10/54, 19%), ciprofloxacina da classe das quinolonas (n = 10/54, 19%), tigeciclina da classe das glicilciclina (n = 50/54, 93%) e colistina da classe das polimixinas (n = 52/54, 96%) (Figura 8).

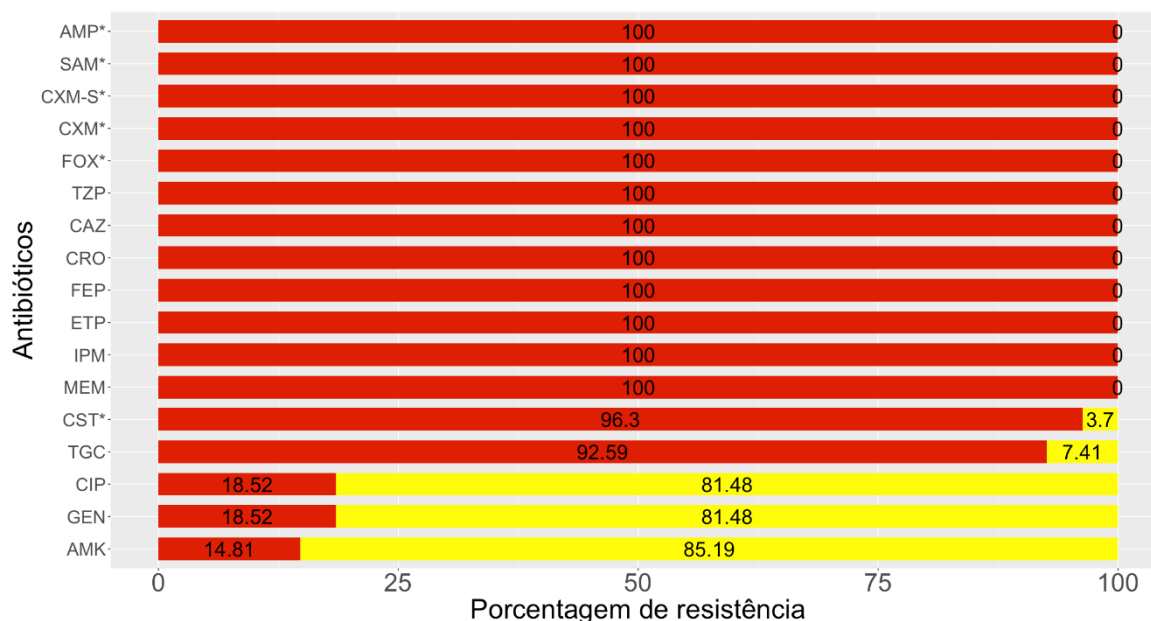


Figura 8: Análise do perfil fenotípico de resistência aos 16 antibióticos analisadas. Antibióticos: Ampicilina (AMP), Ampicilina- sulbactam (SAM), Piperacilina-tazobactam (TZP), Cefuroxima-sódica (CXM-S), Cefuroxima-axetil (CXM), Cefoxitina (FOX), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Cefepima (FEP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), colistina (CST), tigeciclina (TGC), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), ampicilina (AMK). Em vermelho está a porcentagem de resistentes, em laranja a porcentagem de intermediária e em amarelo a porcentagem de sensível a cada antibiótico testado. Antibióticos *: *Serratia marcescens* possuem resistência intrínseca.

4.4 Detecção de genes de resistência a múltiplas drogas

O gene *bla_{KPC}* foram encontrados em 100% (54/54) dos isolados analisados (Figura 9). Os genes *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}* e *bla_{CTX-M-1}* de β-lactamase de espectro estendido (ESBL) foram encontrados em 100% (54/54), 14.81% (8/54) e 12.96% (7/55), respectivamente (Figura 9). Os genes *bla_{SHV}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}* e *mcr-1* não foram detectados (Figura 9).

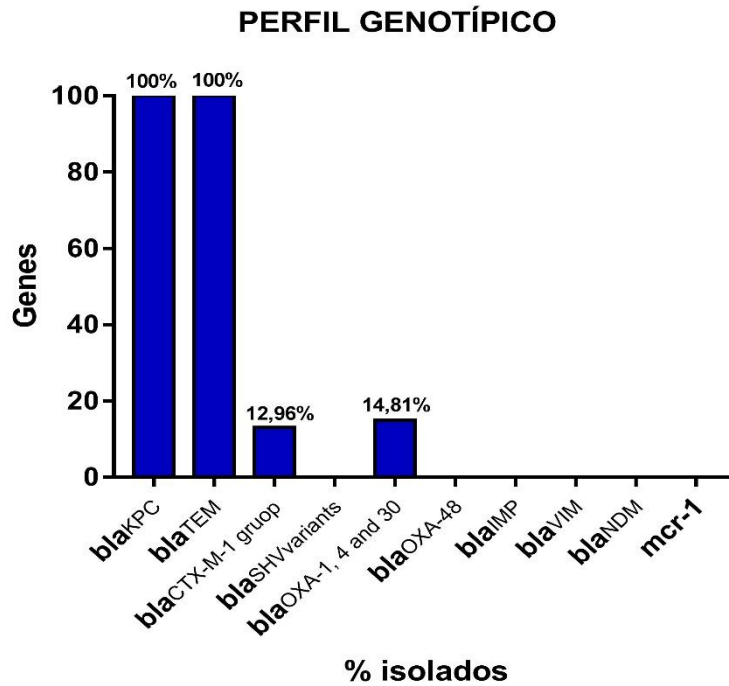


Figura 9: Perfil genotípico dos isolados de *S. marcescens*.

A maior coprodução dos genes foi dos *bla*_{KPC} e *bla*_{TEM} sendo 75.93% (n=41) dos isolados. A segunda maior coprodução foi dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} em 11.11% (n=6) das cepas. As demais coproduções foram *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} com 9.26% (n=5) e *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} com 3.70% (n=2). (Tabela 4).

Tabela 4: Coproduções dos genes de resistência.

Genotipagem	Nº isolados
<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM}	41 (75.93%)
<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	5 (9.26%)
<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA}	6 (11.11%)
<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA}	2 (3.70%)
<i>Total</i>	54 (100%)

A Figura 10 mostra os géis apresentando a amplificação dos genes de resistência em alguns isolados (36, 37, 38 e 40) de *Serratia marcescens*. Os demais géis estão na parte suplementar do trabalho.

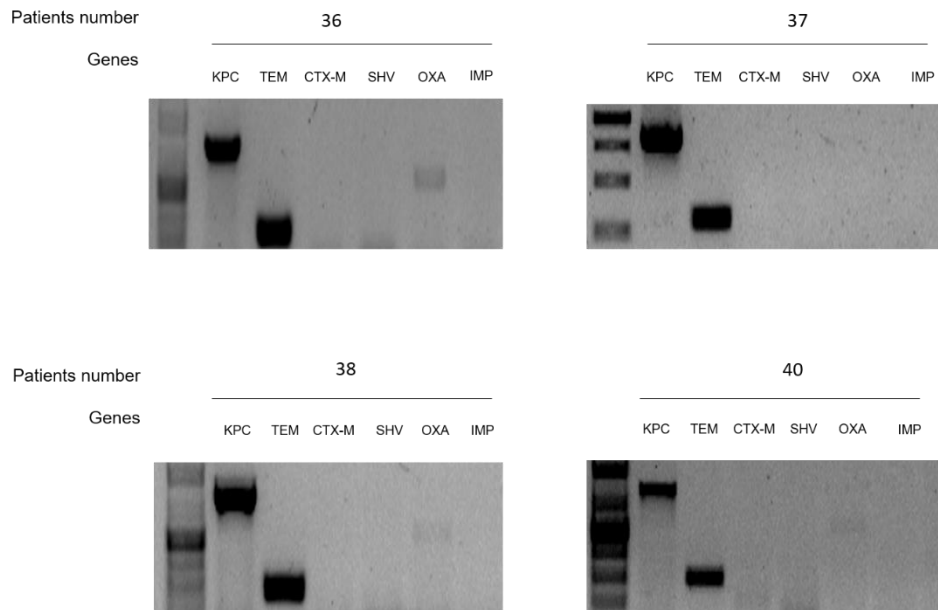


Figura 10: Géis de agarose dos seis genes de resistência analisados dos isolados 36,37,38 e 40.

4.5 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

A similaridade genética entre os isolados foi avaliada por ERIC-PCR. Foi utilizado o software *BioNumeric* para avaliação do padrão de banda possibilitando a geração de um dendrograma (Figura 12). Os resultados indicam que o perfil das bandas obtidas entre os isolados foi muito semelhante, indicando uma alta similaridade entre a maioria das cepas. Quase todas as cepas foram agrupadas em um grande aglomerado denominado cluster B, compartilhando uma similaridade genética de 86,5% (Figura 12). Além disso, o cluster B foi separado em três subgrupos denominados B1 e B2, com 21 cepas compartilhando uma similaridade genética de 96,1% e cluster B3 contendo 31 cepas com 100% de similaridade genética. Duas linhagens (Sm38 e Sm40) foram agrupadas separadamente dentro de um cluster chamado A.

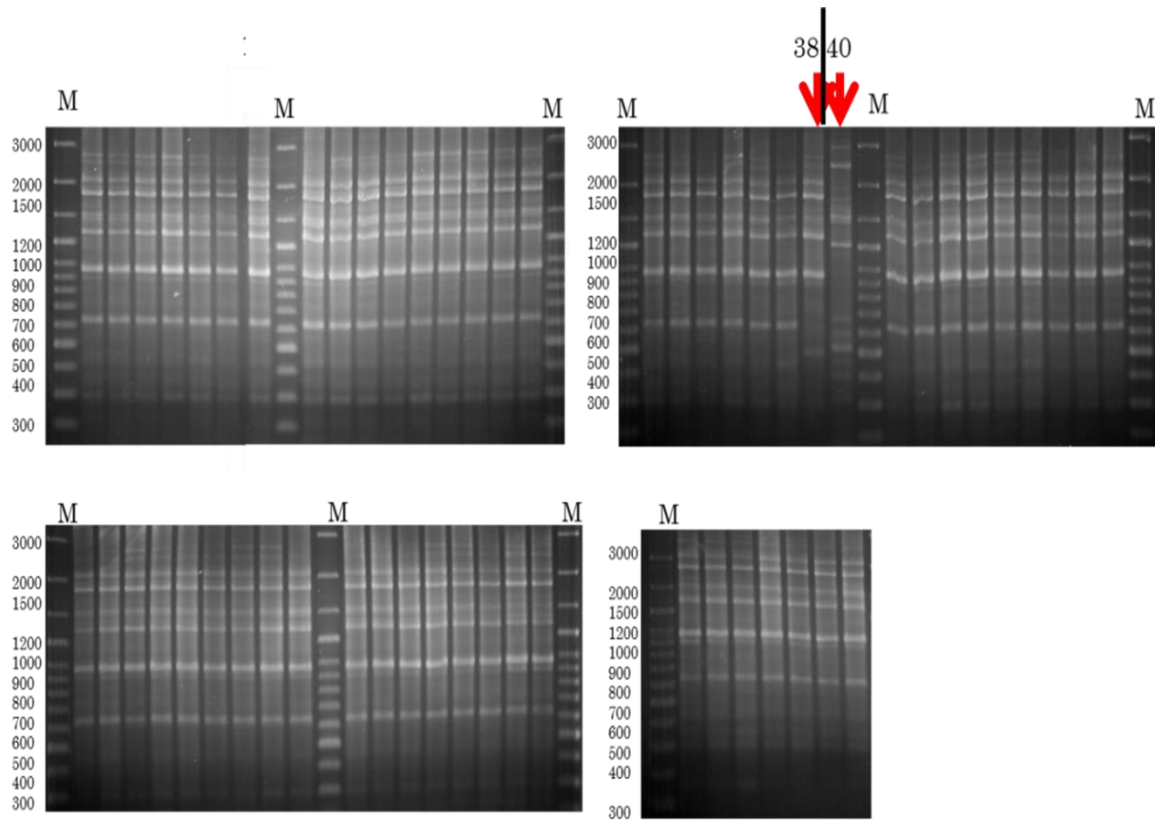


Figura 11. Produtos das reações de ERIC-PCR dos isolados de *S. marcescens*. As três setas indicam os isolados que tiveram padrões de bandas diferente dos demais.

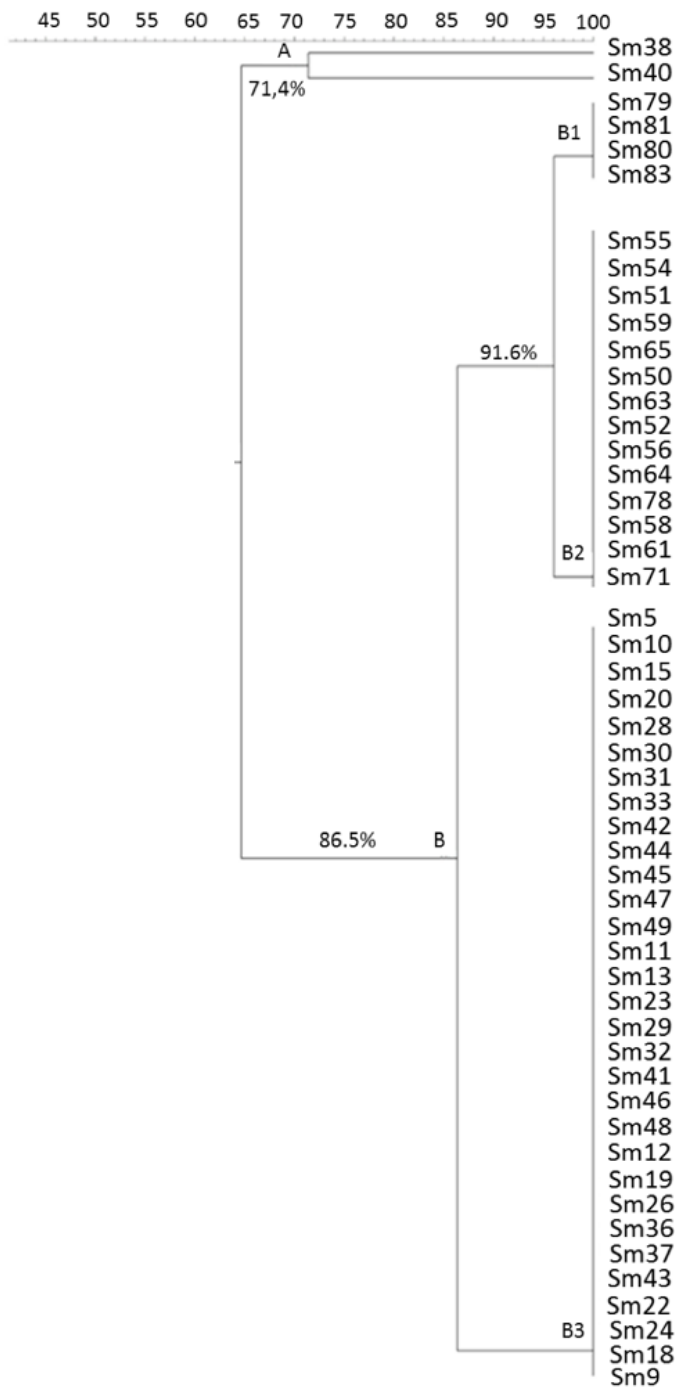


Figura 12: Dendrograma gerado a partir da análise de ERIC-PCR.

5. DISCUSSÃO

Serratia marcescens é um importante patógeno oportunista e as infecções ocasionadas por essas bactérias estão frequentemente associadas a unidades de terapia intensiva, unidades cirúrgicas e unidades de diálise (MARTINEAU et al., 2018). Os estudos sobre *S. marcescens* no Brasil são escassos. Desse modo, o presente estudo descreve pela primeira vez a presença de isolados de *S. marcescens* MDR, produtoras carbapenamases (bla_{KPC}) e de beta-lactamases de espectro estendido (extended-spectrum beta-lactamases – ESBL) (bla_{TEM} , $bla_{CTX-M-1}$ e bla_{OXA-1} grupo), no Estado do Tocantins, Brasil. Tocantins é o estado mais novo do Brasil (30 anos), está localizado a sudeste da Região Norte, compartilha fronteiras com seis estados e os fluxos migratórios nesse estado têm uma grande magnitude.

Os isolados de *S. marcescens* foram obtidos na UTI e com maior frequência em pacientes do gênero masculino e com idade de 60 anos ou mais, o que está de acordo com alguns estudos que demonstraram que a idade avançada e o gênero masculino estão associados com um aumento no risco de infecção por *S. marcescens* (O'HORO et al., 2017; KOJI et al., 2015). As amostras que continham a maior quantidade de *S. marcescens* foram obtidas do aspirado traqueal (33%), seguido de sangue, swab retal e feridas. Nossos dados corroboram com estudos realizados anteriormente por KIM et al., 2015; LIOU et al., 2014, que relataram que a principal porta das infecções causadas por *S. marcescens* é o trato respiratório. No entanto, outros estudos também demonstraram a presença de *S. marcescens* em vários sítios, incluindo corrente sanguínea (SEYAVE et al., 2006) (US et al., 2017).

Dos isolados analisados 24% (n=13) foram classificados como multidroga-resistentes (MDR), apresentando resistência a pelo menos três ou mais classes dos antibióticos analisados (MAGIORAKOS et al., 2011). As espécies de *Serratia* são

intrínsecamente resistentes a vários antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilina G, ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefuroxima, cefamicina, cefalosporinas de espectro estreito, nitrofurantoina, tetraciclina e colistina (BOUCHILLON et al., 2004; MAHLEN, 2011; STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003; YU et al., 2003). Assim como em outras *Enterobacteriaceae*, a produção de enzimas β -lactamases inativam certos agentes antimicrobianos β -lactâmicos, sendo esse o mecanismo mais comum de resistência em *S. marcescens* (YANG et al., 2012). Apesar da terapia atual para infecções por *Serratia* incluir um aminoglicosídeos mais um beta-lactâmico e/ou um carbapenêmico, já que o uso único de um beta-lactâmico pode selecionar cepas resistentes (MORADIGARAVAND et al., 2016), a produção de enzimas beta-lactamases pode ser responsável pela resistência observada em nosso estudo, pois todas as cepas de *S. marcescens* foram resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos avaliados.

Estudos também demonstraram que o uso simultâneo da maioria dos beta-lactâmicos pode ser ineficaz e apenas gentamicina, imipenem, quinolonas e, em menor escala, tigeciclina, parecem ainda oferecer um tratamento efetivo (TUON et al., 2017; MORADIGARAVAND et al., 2016). No entanto, as características farmacocinéticas de alguns desses medicamentos não são favoráveis em infecções graves (TUON et al., 2017) e a resistência mediada por cromossomos ou plasmídeos foram identificadas para alguns desses antibióticos (LIVERMORE, 1995; STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003). Em nosso estudo, a maioria das cepas de *S. marcescens* foram sensíveis apenas aos aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) e à fluorquinolona (ciprofloxacina). Os aminoglicosídeos são os antibióticos mais antigos e, que nos últimos anos, tem sido usado com menos frequência, desse modo, alguns estudos sugerem que isto tenha preservado suas atividades contra algumas bactérias resistentes que ocasionam infecções de difícil tratamento (FALAGAS; GRAMMATIKOS; MICHALOPOULOS, 2008; GAD; MOHAMED; ASHOUR, 2011).

As cepas de *S. marcescens* apresentaram uma baixa resistência à ciprofloxacina (19%), resultados semelhantes foram encontrados por Sheng et al., (2002), que observou de 20-30% de resistência à quinolona nos isolados de *S. marcescens*. Ainda em relação à sensibilidade observada à ciprofloxacina, estudos tem demonstrado que a taxa global de resistência às fluorquinolonas está diminuindo, presumivelmente refletindo o aumento da dependência da terapia com beta-lactâmicos (SADER et al., 2014). No entanto, é importante considerar que *S. marcescens* possui alta capacidade adaptativa, desse modo, ainda existem taxas muito divergentes de resistência às fluorquinolonas entre as instituições (MAHLEN, 2011; SADER et al., 2014; YOUNG; MOODY; MORRIS, 1980), inclusive no Brasil.

Nos últimos anos, a tigeciclina, um derivado da minociclina, tem sido usada como uma alternativa no tratamento para enterobactérias MDR. No entanto, estudos relataram que a suscetibilidade reduzida dos isolados de *S. marcescens* a este antibiótico de amplo espectro, pode estar relacionado a regulação positiva da bomba de efluxo *SdeXY-HasF* (HORNSEY et al., 2010). Nosso estudo não avaliou bombas de efluxo, entretanto, nossos dados demonstraram que as cepas *S. marcescens* apresentaram 93% de resistência à tigeciclina. Estudos realizados por Hawser et al. (2012) também demonstraram um declínio semelhante na suscetibilidade à tigeciclina em cepas *S. marcescens*.

A ocorrência de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenamases levou ao uso generalizado de colistina, o que ocasionou o aparecimento de bactérias naturalmente resistentes a esse antibiótico, como as pertencentes ao gênero *Serratia* (MERKIER et al., 2013; TUON et al., 2017). Em nosso estudo, além da resistência à colistina, as cepas apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Esses dados são preocupantes, pois surtos produzidos por isolados multirresistentes de *S. marcescens*, que já são naturalmente resistentes a vários antibióticos, incluindo a colistina, são geralmente descritos com taxas altas de desfechos fatais em todo o mundo (MERKIER et al., 2013).

Carbapenêmicos, como imipenem e meropenem são antibióticos importantes, uma

vez que são frequentemente utilizados para tratar infecções graves causadas por organismos da família *Enterobacteriaceae* resistentes à cefalosporinas de amplo espectro (STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003). A resistência aos carbapenêmicos era incomum nas espécies de *Serratia* (STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003), entretanto, a emergência de cepas resistentes a essa classe de antibióticos, tem emergido em várias localidades do mundo (LIOU et al., 2014; YIGIT et al., 2001). Em nosso estudo, todas as cepas de *S. marcescens* foram resistentes a todos os beta-lactâmicos testados, inclusive os carbapenêmicos. Nossos dados corroboram com estudos que mostram que as infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos muitas vezes não respondem ao tratamento convencional (OKOCHE et al., 2015), pois as carbapenamases produzidas são capazes de hidrolisar não apenas os carbapenêmicos, mas também todos os outros agentes beta-lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Em nosso país, apesar de existirem poucos estudos relacionados à resistência aos carbapenêmicos em *S. marcescens*, resultados similares ao nosso foram encontrados por (SILVA et al., 2015), que isolaram *S. marcescens* resistentes ao imipinem, meropenem e ertapenem, em amostras coletadas de diferentes sítios de infecção, em pacientes que estavam internados em UTI, de uma outra localidade no Brasil.

No Brasil, em *S. marcescens* o tipo mais comum de resistência aos carbapenêmicos se deve à produção da carbapenamase (KPCs), principalmente do tipo KPC-2 (RIBEIRO et al., 2013; DA COSTA GUIMARÃES et al., 2013; MILISAVLJEVIC et al., 2004), que é codificada pelo gene *bla_{KPC-2}*. Esses relatos corroboram com nossos resultados, que mostraram a presença do gene *bla_{KPC}* em todos os isolados. Esses dados também são preocupantes, pois os genes de *bla_{KPC}* possuem um elevado potencial de disseminação horizontal entre diferentes clones da mesma espécie enterobacteriana (BARBIER et al., 2010) ou mesmo entre diferentes gêneros (CAI et al., 2008; RASHEED et al., 2008). A ocorrência de isolados de *S. marcescens* produtores de KPC no Brasil foi também relatada por (BATHOORN et al., 2016), em pacientes internados em unidade de

terapia intensiva (UTI). Embora a ocorrência de *bla*_{KPC-2} em isolados de *S. marcescens* seja mais descrita em cepas nosocomiais (CAI et al., 2008) e, em episódios isolados de infecções por *S. marcescens* (TSAKRIS et al., 2010), pacientes em UTI podem continuar colonizados por isolados produtores de carbapenamase por longos períodos após a alta hospitalar, permitindo sua disseminação potencial para os domicílios e a comunidade (TSAKRIS et al., 2010; GOTTESMAN et al., 2008). Outras carbapenemases mais comuns, que ocasionam resistência aos antibióticos carbapenêmicos, incluem os tipos oxacilinase-48 (OXA-48) e as metalo-beta-lactamases (VIM), imipenemase (IMP) e New Delhi metalo-beta-lactamase-1 (NDM-1), que são codificadas pelos genes determinantes de resistência ao carbapenem *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}, respectivamente (POIREL et al., 2011). Em *S. marcescens*, estudos tem detectado a presença dos genes *bla*_{NDM} (ZHANG et al., 2017), *bla*_{VIM} (NASTRO et al., 2013; OKOCHE et al., 2015), *bla*_{OXA-48} (POTRON et al., 2011), *bla*_{IMP} (OSANO et al., 1994). Em nosso estudo, esses genes não foram encontrados, no entanto, (MAGYVE et al., 2014) descreveram um surto no Brasil causado por isolados de *S. marcescens* produtores de *bla*_{IMP}.

Em comum com as *Enterobacteriaceae*, *S. marcescens* apresentam o gene *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV-1}, que expressam beta-lactamases classe A clássicas, codificadas por plasmídeos que hidrolisam as penicilinas e as cefalosporinas de primeira geração (QUEENAN; BUSH, 2007). Em nosso estudo, o gene *bla*_{TEM} foi detectado em todos os isolados e o *bla*_{SHVvariants} não foi encontrado em nenhum isolado. *S. marcescens* frequentemente carregam o gene *bla*_{CTX-M} (YU et al., 2003), no entanto, nossos dados mostram que *bla*_{CTX} (15%) e o *bla*_{OXA-1, 4 e 30} (16%) estavam presentes e apresentando frequência similares. No Brasil e em outras regiões existem poucos estudos sobre a presença dos genes *bla*_{OXA-1, 4 e 30} sozinho ou em associação com os genes beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}), em *S. marcescens*. Estudos realizados por Kim et al., (2005) mostraram que o gene *bla*_{OXA-30} foi detectado em associação com *bla*_{CTX-M-3} e (SOWMIYA; MALATHI; MADHAVAN, 2012) detectou a presença do *bla*_{OXA} com *bla*_{SHV}. Outros estudos têm

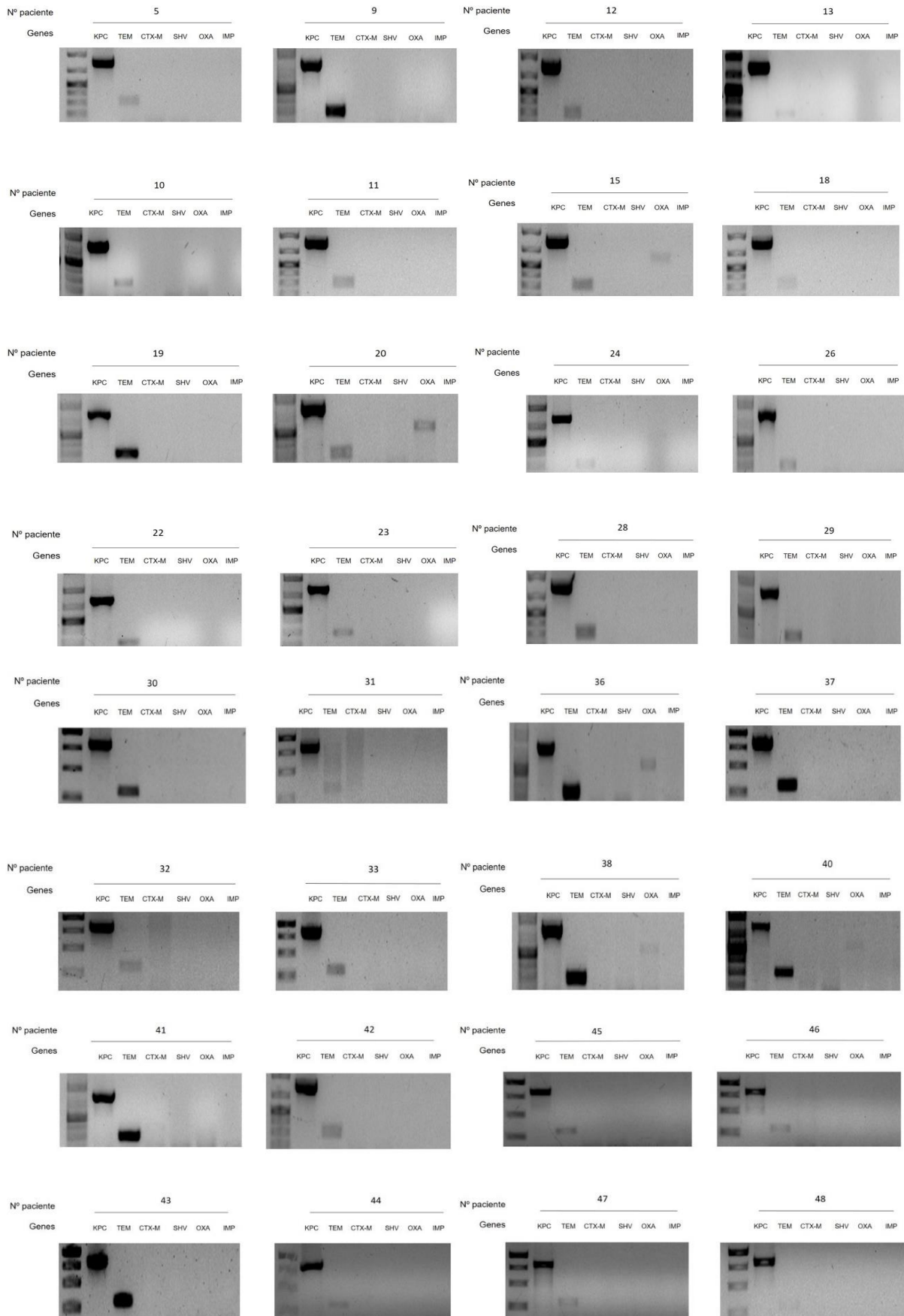
mostrado a associação de *bla*_{CTX-M} com *bla*_{TEM}; *bla*_{CTX-M-2} com *bla*_{TEM} (TENOVER et al., 2013) e *bla*_{SHV} com *bla*_{TEM} (SOWMIYA; MALATHI; MADHAVAN, 2012). Nossos estudos parcialmente corroboram com esses dados, pois foi encontrada associação de *bla*_{OXA} com *bla*_{TEM}; *bla*_{OXA} com *bla*_{CTX-M} e com *bla*_{TEM}; e também *bla*_{CTX-M} com *bla*_{TEM}. Embora existam discrepâncias na taxa de frequência e na genotipagem de *S. marcescens* produtoras de ESBL (CHENG et al., 2006), as resistências aos antibióticos beta-lactâmicos observada em nosso estudo, pode ter sido ocasionada pela presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, pois a produção das enzimas beta-lactamases de amplo espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1) ocasiona resistência aos antibióticos ampicilina, ticarcilina, piperacilina, piperacillin/tazobactam e cefalosporinas e as enzimas CTX-M possuem atividade hidrolítica contra a cefotaxima (SUGUMAR et al., 2014). Além disso, nossos dados sugerem uma transmissão potencial de resistência entre as espécies bacterianas, pois as ESBLs são geralmente codificadas por plasmídeos que abrigam genes para resistência a antibióticos (NEUWIRTH et al., 1996).

Resultados ERIC-PCR mostraram uma alta similaridade genética entre as cepas. A maioria das linhagens compartilha a similaridade genética de 86,5%. As cepas foram agrupadas quase inteiramente em um grande aglomerado denominado B, que foi separado em três subconjuntos denominados B1 (4 cepas), B2 (17 cepas) e B3 (31 cepas), das quais cepas pertencentes a cada uma possuem 100% de similaridade genética. Esses resultados indicam que, embora as bactérias tenham sido isoladas de diferentes pacientes e órgãos, as *S. marcescens* circulantes nesse hospital são altamente relacionados geneticamente. Além disso, o agrupamento de cepas no cluster B mostram uma alta taxa de proximidade genética entre os isolados sugere a disseminação de clones dentro da UTI.

Em conclusão, o padrão de resistência exibido pelos isolados clínicos e o potencial de transmissão desses clones, refletem a importância em pesquisar os fatores associados ao aumento da frequência e/ou emergência de infecções ocasionadas por *S. marcescens* em ambientes hospitalares. É crucial eliminar fontes de desenvolvimento de resistência e

seus reservatórios, como também realizar uma vigilância padronizada e a notificação obrigatória de infecções, para que se possa obter dados cruciais para uma avaliação contínua dos riscos e tomada de decisões mais eficazes para o controle das bactérias MDR em ambiente hospitalar.

6. Material suplementar



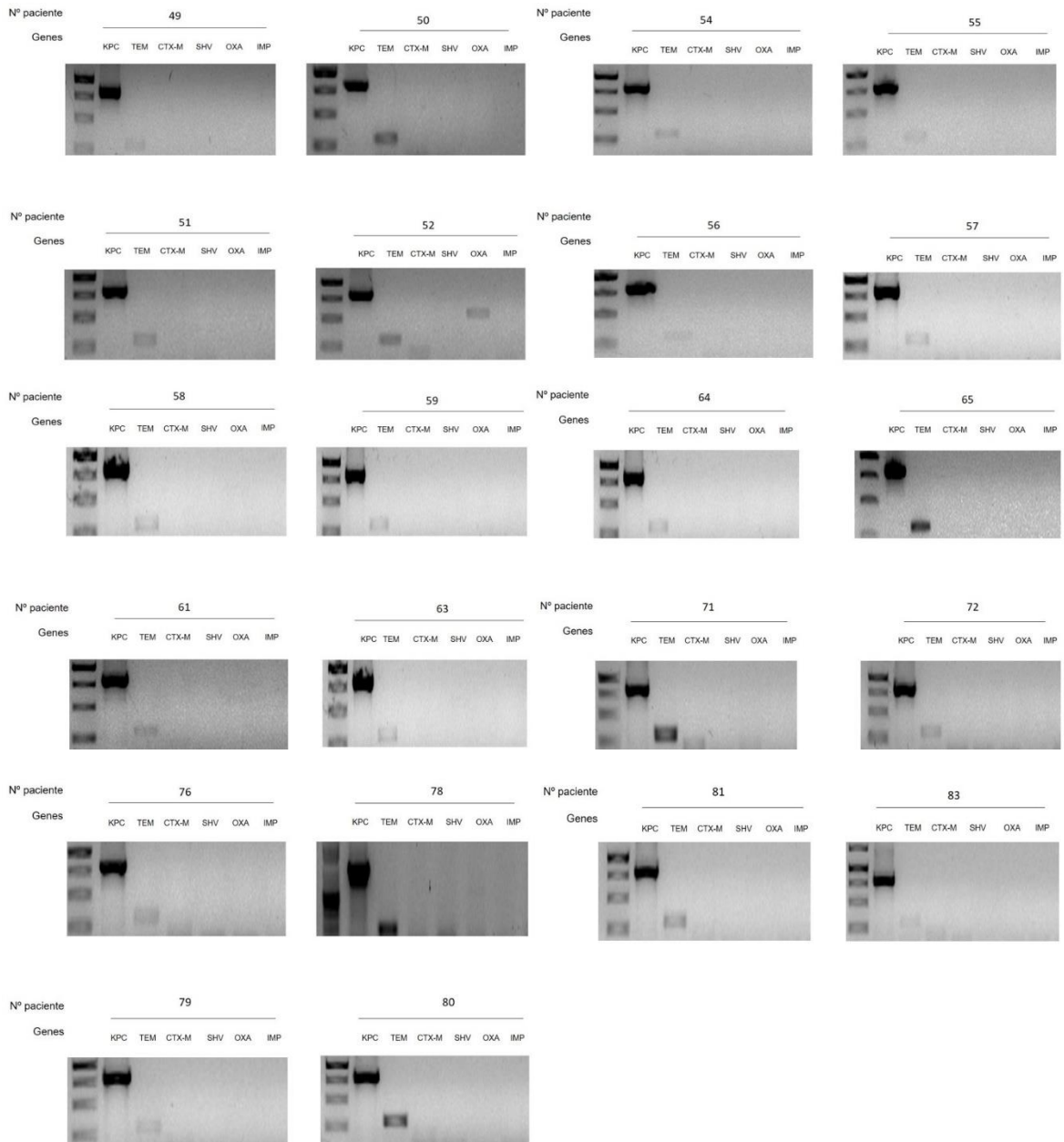


Figura 13: Géis dos genes de resistência dos isolados de *Serratia marcescens*.

10. REFERENCIAS

ANDRADE, D. DE; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências.

Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 18, n. 1, p. 27–33, mar. 2006.

ANTIMICROBIANOS - BASES TEÓRICAS E USO CLÍNICO. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 5 fev. 2019.

BARBIER, F. et al. Genesis of a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after in vivo transfer from an imported Greek strain. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 15, n. 1, 7 jan. 2010.

BAROUD, M. et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 1, p. 75–79, 1 jan. 2013.

BATHOORN, E. et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1207–1212, maio 2016.

BAUERNFEIND, A. et al. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1924–31, 1 ago. 1999.

BELL, J. M. et al. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 42, n. 3, p. 193–8, mar. 2002.

BERGAN, T. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. In: ANDRIOLE, V.T. **The Quinolones**, New York, Academic Press. pp. 119-154. 1988.

BILLAL, D. S. et al. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 512, 17 dez. 2011.

Biologia Celular e Molecular, Carlos Azevedo - Livro - WOOK. [s.l: s.n.].

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.

BOUCHILLON, S. . et al. Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001–2002. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 2, p. 119–124, ago. 2004.

BRATU, S. et al. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 776–778, 1 fev. 2005.

CHENG, K.-C. et al. Clinical experiences of the infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* at a medical center in Taiwan. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 59, n. 3, p. 147–52, jun. 2006.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 2, p. 232–60; second page, table of contents, jun. 2001.

COLE, J. M. et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 322–6, fev. 2009.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1791–6, maio 2000.

CROOK, D. W.; SPRATT, B. G. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **British medical bulletin**, v. 54, n. 3, p. 595–610, 1998.

CUENCA, F.F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.22(6), p.355-60, 2004.

DA COSTA GUIMARÃES, A. C. et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing blaKPC-2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 4, p. 369–370, out. 2013.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, mar. 2010.

DOS, F.; DE SAÚDE, S. **Relatório Mundial da Saúde FINANCIAMENTO DOS SISTEMAS DE SAÚDE O caminho para a cobertura universal Organização Mundial da Saúde Organização**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2010/whr10_pt.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2019.

DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, 1 dez. 2012.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201–205, mar. 2009.

FALAGAS, M. E.; GRAMMATIKOS, A. P.; MICHALOPOULOS, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 593–600, 10 out. 2008.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity †. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 395–424, fev. 2005.

GAD, G. F.; MOHAMED, H. A.; ASHOUR, H. M. Aminoglycoside Resistance Rates, Phenotypes, and Mechanisms of Gram-Negative Bacteria from Infected Patients in Upper Egypt. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17224, 17 fev. 2011.

GARAIZAR, J. et al. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5273–81, dez. 2000.

GOTTESMAN, T. et al. Household transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 5, p. 859–60, maio 2008.

HAWSER, S.P., BOUCHILLON, S.K. M., HACKEL, M., CHEN, E.C., KIM. Trending 7 years of in vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative pathogens from the Asia-Pacific region: Tigecycline Evaluation Surveillance Trial (TEST) 2004–2010. **Int J Antimicrob Agents**. 490-495. 2012.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L.; GOODMAN, L. S. (LOUIS S. **Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics, editors Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton.** [s.l.] McGraw-Hill, 2014.

HORNSEY, M. et al. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and cefpirome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 479–482, 1 mar. 2010.

IGUCHI, A. et al. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 8, p. 2096–110, ago. 2014a.

IGUCHI, A. et al. Genome Evolution and Plasticity of *Serratia marcescens*, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 2096–2110, ago. 2014b.

IOSIFIDIS, E. et al. Outbreak of bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric department. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 1, p. 11–15, fev. 2012.

- KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017.
- KIM, J. et al. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1572–1575, 1 abr. 2005.
- KIM, S. B. et al. Risk Factors for Mortality in Patients with *Serratia marcescens* Bacteremia. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 348, mar. 2015.
- KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that Escherichia coli porins function principally as nonspecific channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 28, p. E2629–E2634, 9 jul. 2013.
- KÖRNER, R. J. et al. Ciprofloxacin resistant *Serratia marcescens* endocarditis as a complication of non-Hodgkin's lymphoma. **The Journal of infection**, v. 29, n. 1, p. 73–6, jul. 1994.
- LAGATOLLA, C. et al. Endemic Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired Metallo- β -lactamase Determinants in European Hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 535–538, mar. 2004.
- LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect.**, v. 7, p.88-91, 2001.
- LÉTOFFÉ, S.; GHIGO, J. M.; WANDERSMAN, C. Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 9876–80, 11 out. 1994.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12s, p. S122–S129, dez. 2004.
- LIOU, B.-H. et al. A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 5, p. 387–393, out. 2014.
- LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, fev. 2016.
- LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–84, out. 1995.
- LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

LYERLY, D.; GRAY, L.; KREGER, A. Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia keratitis* and by a serratia protease. **Infect Immun**, v. 33, p. 927-932, 1981.

MAGIORAKOS, A. et al. bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MAGYVE, P. et al. Identification of carbapenemase genes in *Serratia* spp. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P39, 2014.

MAHLEN, S. D. *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.

MAKI, D. G.; GOLDMAN, D. A.; RHAME, F. S. Infection control in intravenous therapy. **Annals of internal medicine**, v. 79, n. 6, p. 867–87, dez. 1973.

MAKIMURA, Y. et al. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Serratia marcescens* LPS. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 1440–1446, 1 nov. 2007.

MARTINEAU, C. et al. *Serratia marcescens* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit: New Insights from Next-Generation Sequencing Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 9, 13 jun. 2018.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1771–7, jul. 2000.

MARTINS, A. F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457–460, 21 dez. 2007.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 153–162, 1 ago. 1993.

MCCORMACK, R. C.; KUNIN, C. M. Control of a single source nursery epidemic due to *Serratia marcescens*. **Pediatrics**, v. 37, n. 5, p. 750–5, maio 1966.

MERKIER, A. K. et al. Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after Colistin Administration in a Hospital Setting. v. 51, n. 7, p. 2295–2302, 2013.

MILISAVLJEVIC, V. et al. Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* Outbreaks in Two Neonatal Intensive Care Units. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 09, p. 719–722, 2 set. 2004.

MORADIGARAVAND, D. et al. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. p. 1–9, 2016.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 776p. 2004.

NASTRO, M. et al. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 7, p. 617–619, jul. 2013.

NAUMIUK, L. et al. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdańsk, Poland, over a 5-year period. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3108–16, jul. 2004.

NELSON, M. L. et al. Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 370–377, fev. 1993.

NEU, H. C.; GOOTZ, T. D. **Antimicrobial Chemotherapy**. [s.l: s.n.].

NEUWIRTH, C. et al. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 1, p. 76–9, jan. 1996.

O’HORO, J. et al. *Serratia* and Surgical Site Infections: Risk factors and Epidemiology. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. suppl_1, p. S650–S650, 1 out. 2017.

OKOCHE, D. et al. Prevalence and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Mulago National Referral Hospital, Uganda. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135745, 18 ago. 2015.

OKUDA, T. et al. Outbreak of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. **Journal of clinical microbiology**, v. 20, n. 4, p. 691–5, out. 1984.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661–9, 1 jun. 1999.

OPLUSTIL, CARMEN PAZ - ZOCCOLI, CÁSSIA MARIA - TOBOUTI, NINA REIKO - SINTO, S. I. **Livro - Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. [s.l: s.n.].

OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 71–8, jan. 1994.

OVERTURF, G.D. Carbapenemases: A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 2010.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 15 mar. 2004.

PARMENT, P. A. et al. Hemagglutination (fimbriae) and hydrophobicity in adherence of *Serratia marcescens* to urinary tract epithelium and contact lenses. **Current microbiology**, v. 25, n. 2, p. 113–8, ago. 1992.

PATEL, J. B.; RASHEED, J. K.; KITCHEL, B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 8, p. 55–62, 15 abr. 2009.

POIREL, L. et al. Genetic Features of *bla*_{NDM-1}-Positive Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, nov. 2011.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 8 abr. 2017.

POTRON, A. et al. Occurrence of the Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase Gene *bla*_{oxa-48} in the Environment in Morocco. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5413–5414, nov. 2011.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 1 jul. 2007.

RASHEED, J. K. et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Type 2 Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* Carrying a Common Plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2066–2069, 1 jun. 2008.

RIBEIRO, V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt_11, p. 1721–1727, 1 nov. 2013.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 33–41, jan. 2008.

RYAN, K., & RAY, G. (s.d.). The bacterial cell. em McGraw-Hill (Eds.), Sherris - Medical Microbiology: **An Introduction to Infectious Diseases** (4^a ed., pp. 9 - 75), Nova Iorque.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 443–448, abr. 2014.

SAMONIS, G. et al. Resistance phenotypes and susceptibility of contemporary *Serratia* isolates in the university hospital of Crete , Greece Resistance phenotypes and

susceptibility of contemporary *Serratia* isolates in the university hospital of Crete , Greece. **Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2017.

SEYAVE, D. et al. Fatal delayed transfusion reaction in a sickle cell anemia patient with *Serratia marcescens* sepsis. **Journal of the National Medical Association**, v. 98, n. 10, p. 1697–9, out. 2006.

SHENG, W.-H. et al. Emerging fluoroquinolone-resistance for common clinically important gram-negative bacteria in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 2, p. 141–147, 1 jun. 2002.

SHIMUTA, K. et al. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 261, 16 dez. 2009.

SILVA, K. E. et al. *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2015.

SOARES, G. M. S. et al. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 20, n. 3, p. 295–309, 2012.

SOUSA, J.C. et al. **Antibióticos**, volume I. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 2016.

SOWMIYA, M.; MALATHI, J.; MADHAVAN, H. N. Screening of Ocular *Enterobacteriaceae* Isolates for Presence of Chromosomal *bla**NDM-1* and ESBL Genes: A 2-Year Study at a Tertiary Eye Care Center. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 9, p. 5251, 7 ago. 2012.

STOCK, I.; GRUEGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 1, p. 35–47, jul. 2003.

SUGUMAR, M. et al. Detection of OXA-1 β -Lactamase Gene of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Stream Infections (BSI) by Conventional PCR and In-Silico Analysis to Understand the Mechanism of OXA Mediated Resistance. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91800, 19 mar. 2014.

TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. W. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, p. s472-83, 1 maio 2003.

TENOVER, F. C. Development and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents: An Overview. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. s3, p. S108–S115, 15 set. 2001.

TENOVER, F. C. et al. Detection of Colonization by Carbapenemase-Producing Gram-

Negative Bacilli in Patients by Use of the Xpert MDRO Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3780–3787, nov. 2013.

TORTORA G.J, FUNKE B.R, CASE C.L. Microbiologia : Editora Artmed, 2012. - 10ª.

Serviço De Controle De Infecção Hospitalar – Hospital Universitário Regional De Maringá (SCIH-HUM). **Manual de Microrganismos Multirresistentes**. Maringá, 2017.

TSAKRIS, A. et al. In vivo acquisition of a plasmid-mediated bla(KPC-2) gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2546–9, jul. 2010.

TUMBARELLO, M.; LOSITO, A. R.; HELEN, G. Optimizing therapy in CRE infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 1, out. 2018.

TUON, F. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a university hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 6, p. 700–702, 1 abr. 2017.

US, E. et al. Wound and soft tissue infections of *Serratia marcescens* in patients receiving wound care: A health care–associated outbreak. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 4, p. 443–447, 1 abr. 2017.

VARGIU, A. V; NIKAIDO, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20637–42, 11 dez. 2012.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., AND LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5, 25–40. doi: 10.1128/JCM.43.1.199-207.2005. 1994.

WACHINO, J. et al. SMB-1, a Novel Subclass B3 Metallo- β -Lactamase, Associated with ISCR1 and a Class 1 Integron, from a Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5143–5149, 1 nov. 2011.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, n. 4, p. 581–6, out. 1985.

WOZNIAK, A. et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. [s.d.].

XIONG, Z. et al. Detection of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in *Shigella sonnei* isolates from China. **Journal of Infection**, v. 55, n. 5, p. e125–e128, nov. 2007.

YANG, H. et al. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. v. 6, n. 21, p. 4427–4437, 2012.

YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 1 abr. 2001.

YOUNG, V. M.; MOODY, M. R.; MORRIS, M. J. Distribution of *Serratia marcescens* serotypes in cancer patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 333–339, 1 maio 1980.

YU, W.-L. et al. Confirmation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens*: preliminary report from Taiwan. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 4, p. 221–4, abr. 2003.

ZHANG, R. et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China. **EBioMedicine**, v. 19, p. 98–106, maio 2017.

São Carlos, 02 de setembro de 2019.

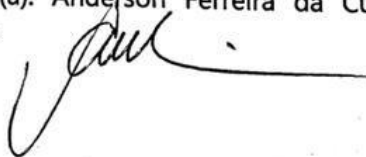
Ref: Carta comprovante da versão final
de teses e dissertações

Eu Prof.(a) Dr.(a) **Anderson Ferreira da Cunha**, Orientador(a) do(a) pós-graduando(a) **Graziela Silva Rezende** do Programa de Pós Graduação **Genética evolutiva e Biologia molecular**, venho por meio desta, AUTORIZAR os tramites para a homologação do(a) supracitado(a) aluno(a), ATESTO que a tese / dissertação intitulada "**Caracterização fenotípica e molecular da susceptibilidade em *Serratia marcescens* isoladas de pacientes em hospital de urgência no estado do Tocantis, Brasil**", é a versão final com as alterações sugeridas pela Banca Examinadora, estando o arquivo tecnicamente correto em sua forma e estrutura e com os devidos agradecimentos aos órgãos de fomento à pesquisa, no caso de recebimento de bolsa e/ou financiamento.

Solicito as devidas providências para o encaminhamento em questão, subscrevo-me.

Atenciosamente,

Prof(a). Dr(a). Anderson Ferreira da Cunha.
Assinatura:






UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Graziela Silva Rezende, realizada em 20/02/2019.



Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Prof. Dr. André Pitondo da Silva
USP