Gladys Villas Bôas do Prado

Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos: epidemiologia, avaliação genotípica e fenotípica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profª. Drª. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Gladys Villas Bôas do Prado
Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos : epidemiologia, avaliação genotípica e fenotípica / Gladys Villas Bôas do Prado Melo. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Serratia marcescens 2.Enterobacteriáceas resistentes a carbapenêmicos 3.Carbapenêmicos 4.Sequenciamento completo do genoma 5.Infecção hospitalar 6.Beta-lactamases

USP/FM/DBD-475/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatórias

Ao meu marido, pela parceria que construímos nessa jornada, pelo apoio e pelo amor.

Ao meu filho, criança doce e amada.

Aos meus pais, eternos torcedores e incentivadores das boas escolhas.

À minha irmã, de corpo e de alma, minha dupla na vida.

Às minhas amigas e meus amigos, que dão as cores à vida

Agradecimentos

- À minha orientadora, Silvia F. Costa, pela paciência e carinho com que me ajudou a concluir esse trabalho. Também pelo brilhantismo e eterna generosidade que tem como professora e pela destacada capacidade de inspirar e imenso comprometimento – quem a conhece sabe.
- Às minhas parceiras no trabalho da SCCIH, Elisa e Maristela, pelas ideias que e pela força de trabalho que me ajudou nessa tarefa.
- À equipe do LIM54, Roberta, Lauro, Camila, Ana Paula, Marina, Juliana, Andréa e Vitor, essenciais em sua preciosa ajuda, sempre dada com empenho e gentileza.
- À equipe da Neoprospecta e às pesquisadoras da faculdade de Veterinária, Luisa e Andreia, que nos auxiliaram na identificação da *Serratia*.
- Ao Carlos Camargo que, com muita paciência e atenção, sempre me ajudou com seus conhecimentos técnicos e a com disponibilização de recursos fundamentais para a nossa pesquisa.
- À Sueli e ao Luiz, pela valiosa ajuda que me deram, sempre com tanta atenção e boa vontade.
- Aos meus amigos queridos, Maura e Lauro, cuja parceria que me impulsionou continuamente para frente nesse desafio
- À professora Anna Sara, que com sua personalidade e qualidades criou um campo magnético de boas pessoas e bons profissionais que formou esse grupo do qual é sempre bom estar perto.
- Às minhas amigas Maura Salaroli de Oliveira e Priscilla Wacker, que há mais de 20 anos me apoiam com sua amizade e carinho
- Ao meu amigo e dupla de vida de estudante, Lauro, generoso e querido, por compartilhar comigo seu conhecimento e suas risadas
- Aos membros da banca qualificação Prof. Anna Sara Levin, Prof. Antônio Carlos Pignatari e Prof. Doroti de Oliveira Garcia pela preciosa colaboração de suas sugestões
- Ao meu marido, Luciano, por ir além do incentivo amoroso que sempre me deu e me ajudar também no trabalho prático, fazendo uma leitura do meu trabalho.
- À minha família querida, pela torcida.

Resumo

Melo GVBP**.** *Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos*: epidemiologia, avaliação genotípica e fenotípica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Serratia marcescens é um agente oportunista, mais frequentemente associado a infecção hospitalar. Tem elevada capacidade de adaptação ao meio e de adquirir resistência aos antimicrobianos. Este estudo é uma coorte retrospectiva de pacientes colonizados ou infectados por *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos (*SmRc*) entre os anos 2010 e 2013, internados no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (ICHC-FMUSP). Foi feito o levantamento dos dados epidemiológicos através da revisão de prontuários e análise de isolados disponíveis em banco de cepas. Foram avaliados fatores de risco para infecção e perfil de sensibilidade por microdiluição em caldo. Também investigamos mecanismos de resistência através de PCR, PFGE e Sequenciamento completo do genoma. Sessenta e três pacientes foram incluídos, 43 colonizados e 20 com infecção, incluindo 12 de corrente sanguínea. Uso de polimixina, insuficiência renal e uso de cateter nos 30 dias que antecederam o isolamento da *S. marcescens* resistente a carbapenêmicos e transplante de células-tronco hematopoiéticas foram correlacionados à infecção na análise bivariada e uso de polimixina foi o único que se manteve na análise multivariada. Quarenta e dois isolados foram analisados, de 35 pacientes e 3 amostras ambientais. O teste de CIM revelou 4 isolados sensíveis aos carbapenêmicos, 42% de sensibilidade a amicacina e 27% de sensibilidade a tigeciclina. Vinte e cinco dos 42 isolados portavam blaKPC-2, que foi a carbapenemase mais frequente. Um isolado carregava blaNDM. O resultado do PFGE indica que há um clone predominante, ao qual pertencem 71% dos isolados. O mesmo perfil foi também encontrado no ambiente. Concluímos que o uso prévio de polimixina como fator de risco independente para infecção por *Serratia marcescens* resistente a carbapenêm reforça a necessidade de políticas de uso racional de antimicrobianos. A elevada clonalidade entre as amostras foi uma forte evidência de transmissão cruzada. A presença da blaKPC-2, blaNDM e de plasmídeos espectro amplo confirmam a capacidade de aquisição de genes de resisstência interespécies. A *Serratia marcescens* é uma espécie pouco estudada e

acreditamos que conseguimos acrescentar conhecimento sobre esse patógeno que constitui uma ameaça constante no cuidado de pacientes críticos.

Descritores: *Serratia marcescens;* Enterobacteriáceas resistentes a carbapenêmicos; Carbapenêmicos; Sequenciamento completo do genoma; Infecção hospitalar; Beta-lactamases.

Abstract

Melo GVBP**.** *Carbapenemic resistant Serratia marcescens*: epidemiology, genotypic and phenotypic evaluation [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Serratia marcescens is an opportunistic agent, most often associated with nosocomial infection. It has high adaptability to the environment and ability to acquire antimicrobial resistance. This study is a retrospective cohort of patients colonized or infected with carbapenem-resistant *Serratia marcescens* (*CrSm*) between 2010 and 2013, admitted to the Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (ICHC-FMUSP). Epidemiological data were collected through medical records and we analysed the isolates available in a strain bank. Risk factors for infection and sensitivity profile for broth microdilution were evaluated. We also investigated resistance mechanisms through PCR, PFGE and Whole Genome Sequencing.Sixty-three patients were included, 43 colonized and 20 with infection, including 12 from the bloodstream. Polymyxin use, renal failure, and catheter use within 30 days prior to isolation of *CrSm* and haematopoietic stem cell transplantation were correlated with infection in the univariate analysis and polymyxin use was the only one that remained in the analysis. multivariate. Forty-two isolates were analyzed from 35 patients and 3 environmental samples. MIC testing revealed 4 carbapenem-sensitive isolates, 42% sensitivity to amikacin and 27% sensitivity to tigecycline. Twenty-five of the 42 isolates carried blaKPC-2, which was the most frequent carbapenemase. An isolate carried blaNDM. The result of the PFGE indicates that there is a predominant clone, to which 71% of the isolates belong.We conclude that the previous use of polymyxin as an independent risk factor for carbapenem-resistant *Serratia marcescens* infection reinforces the need for rational antimicrobial use policies. The high clonality between the samples was strong evidence of cross transmission. The presence of blaKPC-2, blaNDM and broad spectrum plasmids confirm the ability to

acquire interspecies resistance genes. *Serratia marcescens* is a poorly studied species and we believe we have been able to add knowledge about this pathogen which is a constant threat in the care of critically ill patients.

Descriptors: *Serratia marcescens;*.Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; Carbapenems; Whole genome sequencing; Cross infection; Beta-lactamases.

SUMÁRIO

SUMÁRIO xi
Introdução 20
Contexto 21
Revisão da literatura 22
Serratia marcescens 22
História e taxonomia 23
Importância clínica 24
Patogenicidade 25
Fatores de virulência 26
Sensibilidade aos antimicrobianos 28
Porinas 38
Plasmídeos 39
Objetivo 40
Objetivo Geral 41
Métodos 42
Tipo de Estudo 43
Período, Local e população. 43
Critérios de inclusão 43
Levantamento de dados clínicos 43
Microrganismos 44
Aspectos Éticos 45
Análise dos isolados 45
Identificação da *Serratia* por método de sequenciamento de 16S 45
Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo . 46
Pesquisa de carbapenemases por Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 48
Identificação dos isolados pelo método de Mandi-Tof 49
Sequenciamento completo do genoma 49
Sequenciamento do genoma total bacteriano e Análise Bioinformática 50
Análise dos dados 51
Resultados 53
Dados epidemiológicos 54
Descrição do surto e medidas de controle 63
Análise dos dados 65
Características microbiológicas dos isolados 67
Discussão 78
Conclusões 89
Anexos 91

Ficha de investigação epidemiológica de pacientes com isolado de *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos no ICHC 92
Referências..... 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/S2	Ampicillin/Sulbactam
AMI	Amicacina
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
AZT	Aztreonam
BCP	Broncopneumonia
BHI	Brain Heart Infusion
BHR	Broad host ranges
CI	Cateter implantável
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Col	Colonização
COL	Colistina
CVC	Cateter venoso central de curta duração
DCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob
DIA	doença inflamatória abdominal aguda
DM	Diabetes mellitus
DOR	Doripenem
DOX	Doxiciclina
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E_Cirúrgica	Enfermaria de clínica cirúrgica
E_Clínica	Enfermaria da Clínica Médica
E_TR	Enfermaria de transplante renal
ECMG	Enfermaria clínica de gastroenterologia
EIRP	enterobactérias intrinsecamente resistentes a polimixina
EMIN	Enfermaria de moléstias infecciosas
EPSC	Enfermaria do PS da cirurgia
EPSM	Enfermaria do pronto socorro clínico

ESBL	Betalactamases de espectro estendido
ETMO	Enfermaria de transplante de Medula Óssea
ETMO	Enfermaria de Transplante de Medula Óssea
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepime
FOT	Cefotaxima
GEN	Gentamicina
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Infecção de cateter
IC	Insuficiência Cardíaca
ICHC-FMUSP	Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICHC-FMUSP	Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo
ICS	Infecção de corrente sanguínea
ICSL	Infecção de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada
IMI	Impenem
IRA	Insuficiência renal aguda
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IRC	Insuficiência renal crônica
ISC	Infecção de sítio cirúrgico
ISC	Infecção de sítio cirúrgico
ITU	Infecção de trato uninário
LBA	Lavado broncoalveolar
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LEVO	Levofloxacina
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin

MDR	Multidroga resistente
MERO	Meropenem
MIN	Minociclina
MLST	Multi-locus sequence typing
MM	Mieloma múltiplo
Omp	Outer membrane porins
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Pronto Socorro
P/T	Piperacilina / Tazobactam
PBPs	Penicillin-biding proteins
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
POL	Polimixina
PS neuro	PS da neurologia clínica
RCU	Retocolite ulcerativa
SAF	Síndrome anticorpo antifosfolípide
SCG	Sequenciamento completo de genoma
SCG	Sequenciamento Completo de Genoma
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SmRc	*Serratia* marcescens resistente a carbapenêmicos
SVD	Sonda vesical de demora
SXT/TMP	SulfametoxazolTrimethoprim
TAZ	Ceftazidima
TCE	Trauma crânio encefálico
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TGC	Tigeciclina
TIM	Ticarcilina/ ácido clavulâmico
TMO	Tranplante de medula óssea
TOB	Tobramicina
Tx	Transplante
UARR	UTI de recuperação anestésica
UCC	UTI cirúrgica

UCH	Unidade de Terapia Intensiva do Fígado
UCH	UTI da cirurgia do fígado
UMIN	UTI de moléstias infecciosas
UPSC	Unidade de Terapia Intensiva do Pronto Socorro da Cirurgia
UPSM	Unidade de Terapia Intensiva do Pronto Socorro da Clínica Médica
UPSM	Unidade de Terapia Intensiva da Clínica Médica do Pronto Socorro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VM	Ventilação mecânica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas produzidas pela *Serratia* spp que têm ação conhecida na interação com o hospedeiro

Tabela 2- Genes de virulência na Serratia e suas ações mais conhecidas relacionadas às patologias em humanos

Tabela 3. Esquema de classificação para β-lactamases, expandida de Bush et al.(BUSH; JACOBY, 2010)

Tabela 4. Característica das carbapenemases mais comuns das Enterobacteriaceae (LOGAN; WEINSTEIN, 2017)

Tabela 5. Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2017) para enterobactérias.

Tabela 6. Condições de corrida estabelecidas para PFGE de S. marscecens em CHEF DRIII – BioRad. FMUSP, São Paulo.

Tabela 7. Primers para detecção de carbapenemase por PCR

Tabela 8. Dados epidemiológicos e demográficos de 63 pacientes infectados ou colonizados por SmRc no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

Tabela 9. Características clínico-demográficas dos pacientes com infecção ou colonização por Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

Tabela 10. Características clínico-demográficas de 11 pacientes de transplante de medula óssea com infecção ou colonização por Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

Tabela 11: Resultados da pesquisa de SmRc em ambiente na UPSM no ICHC-FMUSP, em outubro de 2012

Tabela 12: Comparação entre as proporções das características clínicas e epidemiológicas entre pacientes com e sem infecção por SmRc no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013

Tabela 13. Resultados da análise de concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo pelo método convencional e pelo método comercial, Sensititre (dos isolados de Serratia marcescens resistente a carbapenêmicos no ICHC : 39 amostras clínicas de Serratia mascecens e 3 amostras ambientais (2010-2013)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética das carbapenemases, metalocarbapenemases e serinas, com seu conteúdo percentual médio de bases GC, de acordo com grupos e propriedades fenotípicas

Figura 2: Análise molecular (PCR, PFGE e sequenciamento completo do genoma) e CIM de ertapenem, amicacina, meroperem e tigeciclina de 42 amostras de SmRc do ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP, do período de 2010 a 2013 e dados epidemiológicos

Introdução

Contexto

Durante a maior parte da história, as doenças infecciosas foram uma das principais causas de morte, juntamente com a fome. O século XX, no entanto, foi marcado pelo desenvolvimento de tecnologias que provocaram uma mudança significativa nesse panorama, como a descoberta dos antimicrobianos (CDC, 1999). Lançada oficialmente na década de 40, a penicilina oferecia a possibilidade de impedir complicações e morte por doenças como pneumonia e sífilis, dentre tantas outras, o que significou um salto em qualidade e perspectiva de vida. Porém, ainda na mesma década, foram descritos os primeiros casos de resistência bacteriana ao antibiótico, constatação de uma característica que persiste: não demora que surjam cepas resistentes aos antimicrobianos que passam a ser comercializados. Logo, um grande obstáculo para os controles de infecções hospitalares. As primeiras duas décadas do século XXI foram marcadas por um grande aumento de novos mecanismos de resistência entre as enterobactérias contra todas as classes de antimicrobianos. Para difundir a dimensão deste problema, membros da Organização Mundial de Saúde, dedicaram o dia mundial de saúde de 2011, ao combate á resistência aos antimicrobianos (WHO, 2011). Em 2014, um relatório da Organização Mundial de Saúde

revelou que em 6 regiões monitoradas havia *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração e a carbapenêmicos em duas delas. A *Serratia marscecens* resistente a carbapenêmicos (*SmRc*) foi descrita pela primeira vez em 1982, mas casos clínicos eram raros até 2006 quando foram notificados os primeiros microrganismos isolados portadores de genes móveis codificadores de resistência a carbapenêmicos (YANG; WU; LIVERMORE, 1990; PETERSEN; TISA, 2013; WHO, 2016). A partir desse achado, a incidência de *SmRc* vem crescendo e ganhando importância para o estudo da epidemiologia hospitalar. Em 2010, o primeiro isolado de *SmRc* foi identificado no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo. O surgimento desse novo perfil de resistência gerou preocupação tanto para a equipe assistencial quando para a equipe de controle de infecção que resultou no desenvolvimento do projeto apresentado neste trabalho.

Revisão da literatura

Serratia marcescens

O gênero *Serratia* pertence à família Enterobacteriaceae, descrito pela primeira vez em 1824 pelo italiano Bartolomeo Bizio. O cientista percebeu a formação de uma substância avermelhada, que cunhou como "sangramento do pão", algo que surgia quando havia muita umidade. A microbiologia era ainda pouco conhecida, mas isto não impediu que o autor conseguisse reproduzir o fenômeno em laboratório. Assim, notou o crescimento rápido de colônias bacterianas avermelhadas que decaíam (marcescens em latim) em 24 horas para uma forma fluida e viscosa. Característica que o fez batizar de: *Serratia marcescens*, à primeira espécie descoberta do gênero. Após avanços da microbiologia, foi descoberto que a cor avermelhada é fruto da produção de prodigiosina. Esta proteína é parte do arcabouço de enzimas que permitem sobrevivência em condições extremas (tabela 1), como quando expostas aos desinfetantes e que também permite as bactérias a consumirem várias formas de carbono (KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013). A serratia é conhecida por possuir múltiplas estratégias de sobrevivências frente ás mudanças ambientais e também às ações de competidores, empregando formas bem sucedidas de equilibrar gasto energético e adequação competitiva (fitness) (LAZZARO; FELDMAN; GARCÍA VÉSCOVI, 2017).

Tabela 1. Proteínas produzidas pela *Serratia* spp que têm ação conhecida na interação com o hospedeiro (KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013)

.

Componente	Alvo	Efeito
Protease(s)	Células epiteliais, mediadores de imunidade	Degradação proteica, lise celular, pró inflamatória em vertebrados
Hemolysina	Glóbulos vermelhos, Células epiteliais	Lise celular
LPS	Vários tipos celulares, substratos ricos em Chitina	Adesão, pró inflamatória em vertebrados

	como paredes de células fúngicas	
N-Acyl homoserina lactonas	Células bacterianas	Motilidade, formação de biofilme e exoenzimas
Prodigiosina	Fungos, bactérias, células cancerígenas, tripanossoma, vírus	Supresão de crescimento de microrganismos e indução de apoptose em células tumorais
Zeamine I, II e III	Bactérias Gram-positivas and Gram- negativas	Efeito antibiótico
Carbapenem	Bactérias Gram-positivas and Gram- negativas	Efeito antibiótico
Bacteriocinas	Bactérias Gram-positivas and Gram- negativas	Efeito antibiótico

História e taxonomia

As primeiras espécies de *Serratia* patogênicas foram descritas em plantas, insetos, nematóides, corais e por muito tempo foram consideradas inócuas ao ser humano. Foram muitas vezes inoculadas diretamente em voluntários humanos para uso como marcador biológico em experimentos científicos. Nos estudos de Burket e colaboradores, a *Serratia* era inoculada em orofaringe antes de uma extração dentária e depois recuperada em cultura do sangue periférico dos voluntários (BURKET; BURN, 1937). Em 1945 o capitão Tom Paine, do exército Americano, descreveu as primeiras evidências do potencial patogênico desse gênero de bactérias quando inoculou colônias de *Serratia* em voluntários saudáveis e logo após, encontrou sinais e sintomas de infecção. Mas foi apenas na década de 70, após análise crítica de relatos de literatura, que se reconheceu que a *Serratia* pode causar infecções, algumas letais. Atualmente está claro que este patógeno traz riscos de morte importante quando infectam pacientes já clinicamente comprometidos (MAHLEN, 2011).

Atualmente são conhecidas outras 10 espécies desse mesmo gênero, dentre as quais a *Serratia marcescens* é a mais frequente. São bacilos Gram-negativos de crescimento a uma temperatura ótima de 37° C e pH entre 5 e 9, anaerobiose facultativa, presença de

flagelo e capacidade de mobilidade, elevado potencial de aderência e formação de biofilme e pigmentação vermelha causada pela prodigiosina (BAKKIYARAJ; SIVASANKAR; PANDIAN, 2012). Suas características fenotípicas de identificação são produção de DNAse e oxidase negativa, o que garante acerto em cerca de 85% dos casos, além de capacidade de hidrolisar caseína; não produz ácidos na presença de lactose mas é fermentadora tardia de glicose e sucrose (KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013)

Importância clínica

A maioria das espécies desse gênero pode ser encontrada no solo e em alimentos. Frequentemente não formam colônias em humanos, mas durante surtos de infecção, podem ser encontradas em reservatórios mais comumente, no trato digestivo, na arvore respiratória e no aparelho urinário. Já foram encontradas colônias em unhas postiças de profissionais de saúde, em equipamentos de auxílio para entrega de medicamentos, em antissépticos, entre outros. Possuem, portanto, capacidade de formar colônias em ambientes extremos, uma grande vantagem competitiva, especialmente em hospitais. (BEUCHÉE et al., 2009; KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013). Na comunidade raramente causam infecções, mas para indivíduos hospitalizados a *Serratia* é um importante agente infeccioso. Pois coexiste em hospitais a alta prevalência de indivíduos imunodeprimidos com maior contaminação do meio. Desta forma, provocam infecções na corrente sanguínea (ICS), pneumonia (BCP), ceratite, endocardite, infecção de trato urinário (ITU), osteomielite, meningite e fasceíte necrotizante, entre outras (BEUCHÉE et al., 2009). A incidência da infecção hospitalar por *Serratia* em geral fica abaixo da incidência de infecções causadas por Gram-positivos mais prevalentes como o *Staphylococcus*, e por Gram-negativos não fermentadores e por algumas enterobactérias, como a *Klebsiella* e a *E. Coli*, por exemplo. Em uma casuística do *European Center for Disease Prevention and Control* de 2016, pneumonias por *Serratia* foram a sexta causa de pneumonia mais frequente em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) dentre as notificadas. Foram também a décima dentre as infecções de corrente sanguínea (ICS) – sendo isoladas em cerca de 2% das amostras de sangue (ECDC, 2016). Em São Paulo, dados de 2017 publicados pelo Centro de Vigilância Hospitalar da secretaria do Estado de São Paulo, a *Serratia* é o sétimo Gram-negativo mais frequente em hemoculturas, com 2,31% do total nas UTIs de adultos e 4% nas UTIs pediátricas (CVE, 2017). Em situações

de surto o cenário é diferente, em especial em unidades de cuidado neonatal. Na revisão de Gasteimeier e colaboradores (GASTMEIER, 2014), foram reunidos dados de 48 relatos de surtos em UTIs neonatal e a *Serratia* foi o terceiro agente mais prevalente. Acredita-se que a adaptabilidade a condições extremas de ambiente é um dos principais fatores que explicam esse comportamento. Nos 48 relatos avaliados, a contaminação de equipamentos hospitalares foi considerada a fonte do surto em 10,4% dos relatos, o ambiente, como pias e ralos, em 8,3% e equipamento médico em 2,1% - nenhum caso foi relacionado a mãos de funcionários ou contaminação de drogas.

Patogenicidade

São fatores de risco mais importantes para infecção por *Serratia*: imunossupressão, uso de antimicrobianos prévio, uso de cateteres, doenças crônicas como doença pulmonar crônica e diabetes (LUZZARO et al., 1998). A diabetes e os tumores sólidos estão entre as doenças de base mais frequentemente relacionadas á sepse por *Serratia*.

Gupta e colaboradores (GUPTA et al., 2014) relataram um surto de ICS por *S. marcescens* relacionado ao uso de nutrição parenteral, 37% dos pacientes infectados eram diabéticos, com ou sem câncer. Haddy e colaboradores (HADDY et al., 1996) avaliaram todas as infecções nosocomiais graves por *Serratia sp* ocorridas em dois hospitais e, num total de 56 casos de ICS, as doenças malignas, insuficiência renal aguda ou crônica e diabetes foram as comorbidades mais frequentes. Resultado semelhante foi encontrado por Kim e colaboradores (KIM et al., 2015) que avaliaram 98 casos de pacientes com ICS por *Serratia sp* e observaram tumores sólidos como comorbidade em 36,7% dos casos, diabetes em 30,6% e insuficiência renal crônica em 26,5%. Tumores hematológicos estiveram associados a 10,2% dos casos. Apesar do alto grau de comprometimento do sistema imune típico dos pacientes com tumores hematológicos, a menor relevância dessa população entre as doenças de base como a descrita por Kim é também encontrada em outras publicações. Em Barcelona, 192 pacientes de unidade de transplante de medula óssea foram acompanhados por 7 anos. Ocorreram 72 episódios de ICS – apenas um por *Serratia* (PARODY et al., 2006). Em uma casuística de 519 isolados de infecção de paciente pós transplante de medula óssea a *Serratia* foi agrupada com *Citrobacter* e *Enterobacter* e totalizou 17 casos (3%) (COLLIN et al., 2001). Há apenas um surto de infecção por *Serratia* em pacientes com malignidades hematológicas, descrito por

Knowles e colaboradores em 2000, no qual estiveram envolvidos 24 pacientes, 14 com infecção, incluindo 8 septicemias, e 10 com colonização e nenhum óbito (KNOWLES et al., 2000). A baixa mortalidade dos pacientes envolvidos nesse surto não reflete os dados descritos na literatura, que descreve como fatais 25 a 58% dos casos analisados em estudos anteriores a 2008. Antes também do surgimento de resistência antimicrobiana nos isolados desse gênero.

Com a intenção de avaliar a mortalidade em pacientes com ICS por *Serratia* no panorama da multirresistência, Kim e colaboradores (KIM et al., 2015) levantaram os dados de 98 episódios entre os anos de 2006 e 2012 e encontraram mortalidade de 22,4%. Os isolados incluídos nesse estudo apresentaram sensibilidade às cefalosporinas entre 0% a 50%%. Para levofloxacina a sensibilidade estava ao redor de 60%. Entretanto, a sensibilidade aos carbapenêmicos continuava em 100%. O primeiro surto de *Serratia* portadora de carbapenemase foi descrito em 2012 por Nastro, da Argentina, com apenas 3 casos e 1 óbito por *S. marscecens* produtora de VIM-16 (NASTRO et al., 2013)

Fatores de virulência

A patogênese da infecção por *Serratia* ainda é pouco compreendida – em geral, considera-se que fatores de virulência estudados em outros gêneros apresentem comportamento análogo (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; PETERSEN; TISA, 2014). Para a *Serratia*, foi demonstrado que sua capacidade de sobrevivência a meios agressivos deve-se a ação de um sistema quórum sense, um regulador de densidade populacional baseado em genes de controle de produção de fímbrias, secreção de proteínas de adesão e formação de biofilme. Esse sistema também desencadeia o fenômeno conhecido como "swarming motility" da colônia, que permite sua mobilidade em superfícies sólidas (HORNG et al., 2005; COULTHURST et al., 2006). Em ambiente hospitalar, essas características estão relacionadas com vantagem competitiva, já que dificulta a ação de agentes desinfetantes e antimicrobianos. São conhecidos alguns dos genes que participam desses processos. Entre eles, se destacam os envolvidos na formação de biofilme como os reguladores das adesinas, que promovem afinidade à superfícies abióticas e hidrofílicas, os homólogos *luxI* e *swrI*, dois reguladores, *rssA* e *lipB* e os genes bsmA e bsmB, que controlam o sistema quorum sense para produção de exopolissacárides (DOE et al., 2007; WILLCOX et al., 2007). O *rssA* também parece ter ação reguladora no produção de Sh1A, uma hemolisina importante no processo de penetração tecidual

pela *Serratia*, em conjunto com o *rssB*, que forma o componente RssAB regulador de hemolisina (DOE et al., 2007). Lin e colaboradores demonstrou que a perda do conjunto RssAB pode leva a comportamento celular aberrante com produção descontrolada de hemolisina e aumento da morte de tecidos colonizados (LIN et al., 2010).

A tabela 2 mostra o resumo dos resultados em genética relacionados a virulência conhecidos até agora.

Tabela 2- Genes de virulência na *Serratia* e suas ações mais conhecidas relacionadas às patologias em humanos (DOE et al., 2007; WILLCOX et al., 2007; DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; PETERSEN; TISA, 2014)

Autor/ano	**Gene/ fator de virulência**	**Via metabólica relacionada**
Horng e colaboradores, 2002	SpnIR	Motilidade e secreção de prodigiosina e nucleasse
Labbate e colaboradores 2004; Riedel e colaboradores, 2001	BHL/HHL sintetase	Secreção de protease e formação de biofilme
Slater e colaboradores, 2003	Sma	Secreção de prodigiosina e outros polímeros
Iguchi e colaboradores, 2014	*nrtABC*, *nasAC* e *nasB*	Decodifica nitrito redutase e aumenta a capacidade de sobrevivência na urina
Coulthurst e colaboradores, 2004	*lux*S	Formação de biofilme – possivelmente reduzida em clones MDR de *Serratia*
Shanks e colaboradores, 2007	OxyR	Influencia a produção de fímbria – gene regulador
Lin e colaboradores 2010	RssAB-FlhDC-ShlBA	Regulação quorum sense e produção de hemolisinas
Petersen e colaboradores, 2017	PhoPQ , PrtA4	Secreção de proteases citotóxicas

Sensibilidade aos antimicrobianos

A maioria das espécies de *Serratia* é intrinsecamente resistente a penicilina, macrolídeos, clindamicina, glicopeptídeos, quinupristin-dalfopristin e rifampicina. Algumas delas, como a *S. marcescens*, são também frequentemente resistentes a ampicilina, amoxicilina clavulonato, ampicilina-sulbactam, cefuroxima, nitrofurantoína, tetraciclina e polimixina (PETERSEN; TISA, 2013). Pela resistência à polimixina, ela entra no grupo das chamadas enterobactérias intrinsecamente resistentes a polimixina (EIRP) juntamente com *Providencia spp*., *Neisseria spp.*, *Proteus spp* e *Burkholderia cepacia*.

Os betalactâmicos são drogas de primeira linha no tratamento de infecções provocadas por enterobactérias e, por isso, seu uso é frequente em todo o mundo. Antibióticos deste grupo têm como característica marcante a presença de anel betalactâmico em sua molecula. Esta estrutura liga-se a proteínas superficiais, que são integrantes da cadeia de reações de síntese da membrana celular bacteriana (*penicillin-biding proteins*, PBPs). Este é o mecanismo pelo qual este grupo de antimicrobianos provoca a lise celular. A resistência aos betalactâmicos foi descrita na década de 80, com a descoberta das primeiras betalactamases de espectro estendido (ESBL) e a AmpC. Desde então, elas se disseminaram por todo o mundo e já somam mais de 890 tipos de proteínas diferentes (BUSH; JACOBY, 2010). As classificações mais usadas das betalactamases foram descritas de acordo com a sequência de aminoácidos, como na classificação A, B, C e D de Amber, ou, conforme a classificação de Bush (BUSH; JACOBY, 2010) - divididas em 4 grupos estruturais e em grupos funcionais. A produção dessas enzimas é controlada por genes tanto cromossômicos como de elementos móveis.

O grupo das ESBL é caracterizado por enzimas decodificadas por genes plasmidiais e capacidade de hidrólise de cefalosporinas de amplo espectro, incluindo as de quarta geração. No Brasil, as ESBL descritas são enzimas do tipo TEM, SHV, CTX-M, VED, DES e GES e, em especial, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (SILVA, 2015). A AmpC é uma cefalosporinase codificada tanto por genes cromossômicos como plasmidiais. É resistente a inibidores de betalactamases, como o clavulonato e sulbactam mas tem fraca

capacidade de hidrólise de cefalosporinas de quarta geração, portanto, a susceptibilidade à essas drogas é mantida. Tanto as ESBL como a AmpC podem agir fracamente sobre os carbapenêmicos, mas ambas podem estar associadas à resistência quando em combinação com outros mecanismos de resistência, como redução de porinas de membranas. A expressão dos genes produtores de betalacmatases pode variar conforme a pressão seletiva do meio, o que é de grande importância para o tratamento de infecções na rotina clínica - o aumento na concentração de antimicrobianos indutores pode aumentar sua expressão desses genes e provocar resistência não identificada pelo laboratório de rotina (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010). A *S. marcescens* é portadora do gene cromossomal ampC e frequentemente portadora de ESBL. Suh e colaboradores (SUH et al., 2010) avaliaram 9 isolados de *S. marcescens* resistente a carbapenêmicos de um surto descrito em unidade neurológica quanto ao tipo de mecanismo de resistência. Eles não identificaram carbapenemases ou AmpC plasmidial ou ESBL em nenhum dos isolados, mas notaram a deleção do gene da porina OmpF e concluíram que a AmpC cromossomal associada à essa deleção era o mecanismo de resistência mais provável.

A tabela 3 mostra os grupos de betalactamases e suas principais características fenotípicas.

Tabela 3: Esquema de classificação para β-lactamases, expandida de Bush et al.(BUSH; JACOBY, 2010)

Grupo Bush-Jacoby (2009)	**Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)**	**Classe molecular (subclasse)**	**Substrato discriminativo(s)**	**Inibido por**		**Caracterítica(s) definidora**	**Enzimas representativas**
				Ca ou TZBa	**EDTA**		

1	1	C	Cefalospirinas	Não	Não	Hidrolisa mais Cefalosporinas que Benzilpenicilin a; hidrolisa cefamicinas	*E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NIb	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima e frequentemente outras oximino-β-lactams	GC1, CMY-37
2ª	2ª	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrolisa mais Benzilpenicilin a que Cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	Sim	Não	Hidrolisa semelhante Benzilpenicilin a e Cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro expandido, monobactans	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oxyimino-β-lactamicos (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10

2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro expandido, monobactans	Não	Não	Hidrólise aumentada de oxyimino-β-lactamicos combinado com resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicillina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicillina, cefepime e cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	Não	Hidrólise aumentada de cloxacillina ou oxacillina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro expandido, monobactans	Variable	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacillina e oxyimino-β-lactamicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacillina e carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro expandido	Sim	Não	Hidrolisa Cefalosporinas. Inibido por ácido clavulânico mas não aztreonam	CepA

2f	2f	A	Carbapenens	Variable	Não	Hidrólise aumentada de of carbapenêmicos, oxyimino-β-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3[a]	3	B (B1)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro de carbapêmicos mas não de monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenens	Não	Sim	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

[a]CA, Ácido clavulânico; TZB, tazobactam.

[b]NI, não incluído.

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos datam da década de 70. Diferenciam-se dos outros betalactâmicos pela presença de uma cadeia pentacíclica não saturada ligada a um átomo de carbono. O anel carbapenema liga-se ao anel betalactâmico, composição que possibilita a formação de uma ligação muito estável com vários tipos diferentes de PBP (MELETIS, 2015) e não é quebrada pelas betalactamases mais frequentes. Essa característica levou os carbapenêmicos a serem considerados os mais confiáveis no tratamento de infecções por Gram-negativos (DAVIES et al., 2008)

De modo geral, os carbapenêmicos diferem quanto à meia vida e biodisponibilidade, mas têm características farmacocinéticas semelhantes: não têm absorção intestinal, distribuição extracelular e eliminação predominantemente via renal. A penetração varia conforme o tipo de tecido estudado. Em sistema nervoso central, estudos mostraram concentrações entre 5 e 10% da concentração sérica (TSUMURA et al., 2008;

BLASSMANN et al., 2016), em tecidos articulares foram relatados valores de 50% e em líquido pulmonar e peritoneal de 73-85% (NEUNER; GALLAGHER, 2017).

O fenótipo de resistência aos carbapenêmicos geralmente são resultado de produção de carbapenemase, a mais frequente, ou alterações de estrutura celular, como bombas de efluxo e alteração da expressão das PBP, em combinação com ação de betalactamases (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). A primeira carbapenemase descrita foi a SME, enzima cromossomal Classe A de Amber, isolada em uma *Serratia marcescens* em 1984. Todas as enzimas da classe A de Amber (KPC, GES, IMI), classe B (VIM, IMP, NDM), e classe D (Oxa) têm a capacidade de hidrolisar ao menos parcialmente os carbapenêmicos (MELETIS, 2015).

As Metalobetalactamases (MbL), classe B, são um grupo associado tanto a genes cromossomais como a genes móveis. As mais frequentes em enterobactérias são IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo-b-lactamase), GIM (German imipenemase), SIM-1 (Seoul imipenemase) e NDM (New Delhi metallo-β-lactamase) (MELETIS, 2015).

Da classe A, os genes decodificadores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) são os mais comuns e circulam entre as Enterobacteriaceae do mundo todo (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). KPCs são capazes de hidrolizar todos os betalactâmicos e estão frequentemente associadas a resistência a outras classes de antimicrobianos.

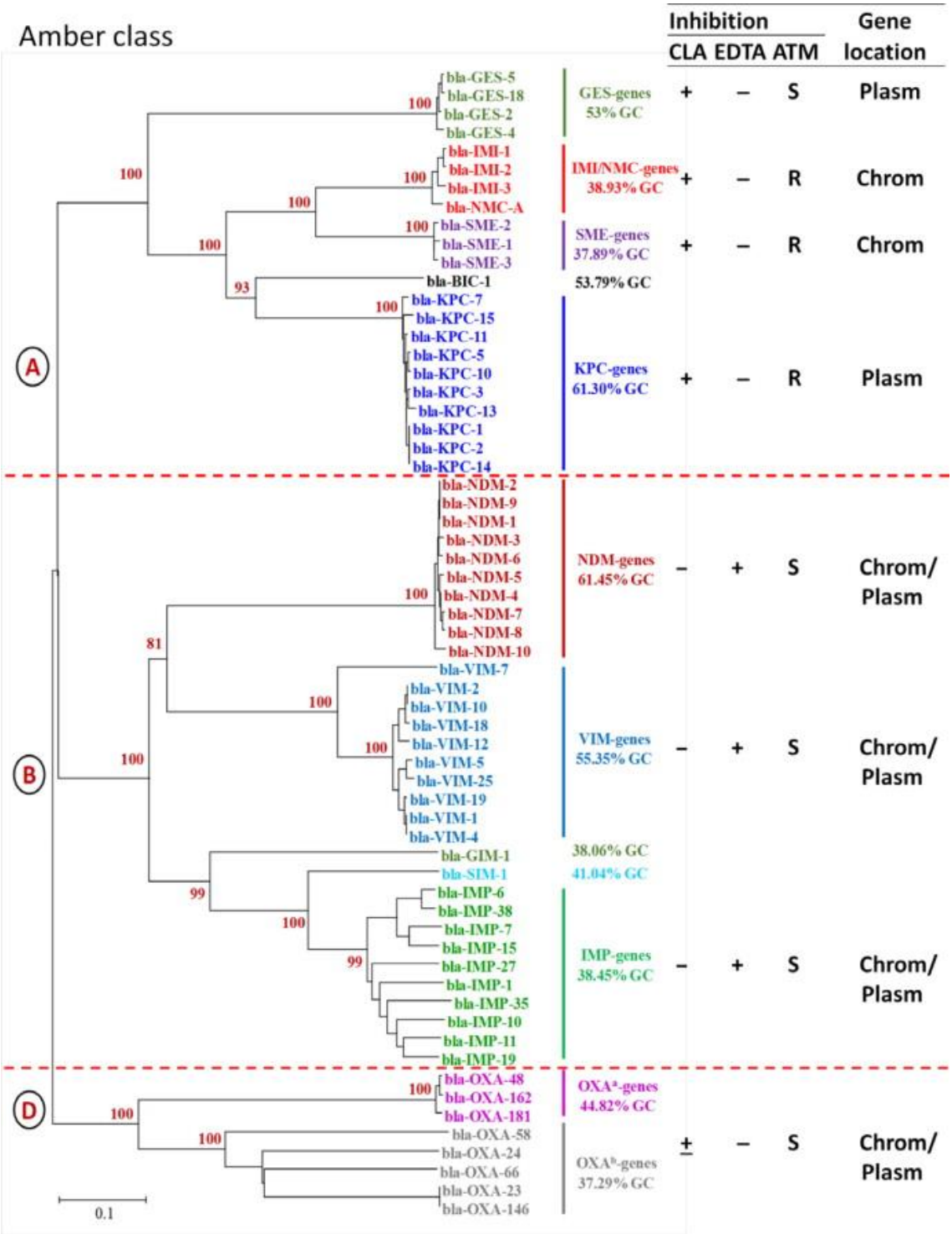
O primeiro relato de MbL adquirida ocorreu em 1994(46), quando a IMP-1 foi detectada em um isolado de *Serratia marcescens* no Japão; era resistente a imipenem e cefalosporinas de quarta geração. Durante muitos anos a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita a esse país, entretanto, atualmente, a IMP-1 tem sido detectada em diferentes microrganismos, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* isolados de diferentes regiões geográficas (OSANO et al., 1994; DIENE; ROLAIN, 2014). Outra MbL importante para a *Serratia* é a NDM, codificada por genes plasmidiais e frequentemente em associação a outros mecanismos de resistência. A primeira NDM descrita foi inicialmente no Paquistão, Índia, em 2008, e teve uma rápida dispersão pelo mundo, o que despertou grande preocupação (CARATTOLI, 2013). Em 2014, Gruber e colaboradores publicaram o estudo de uma

cepa pan-resistente de *S. marcescens* portadora de bla_{NDM-1} na Alemanha (GRUBER et al., 2014). No Brasil, foi identificada pela primeira vez em 2013, no Rio Grande do Sul, em uma amostra de *Providencia rettgeri* e em 2019 foi notificada pela primeira vez em *Serratia* (QUILES et al., 2014; FERREIRA FIRMO et al., 2019).

A classe D de Amber tem como principal representante as oxacilinases (OXA), um grupo de enzimas com graus variados de capacidade de hidrolise de betalactâmicos. A maior parte das enzimas descobertas nesse grupo foram identificadas no *Acinetobacter spp*., mas a OXA-48 é exclusiva das Enterobacteriaceae, até este momento. Em 2018, Yochay e colaboradores identificaram 26 isolados de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos que portavam OXA-48 (REGEV-YOCHAY et al., 2018). No entanto, nem toda variante de OXA-48 confere resistência a carbapenêmicos. Em 2015, Dortet e colaboradores descreveram duas cepas de *S. marcescens* clonais, ambas portadoras de OXA-48, com diferentes perfis fenotípicos com relação à sensibilidade aos carbapenêmicos (DORTET et al., 2015).

A figura 1 mostra a relação fenotípica entre os diferentes tipos de betalactamases.

Figura 1: Árvore filogenética das carbapenemases, metalocarbapenemases e serinas, com seu conteúdo percentual médio de bases GC, de acordo com grupos e propriedades fenotípicas (DIENE; ROLAIN, 2014)



A resistência aos carbapenêmicos é um evento ainda raro, mas que vem crescendo gradativamente nos últimos anos (18). Dados americanos e europeus de 2007 mostram uma taxa de sensibilidade para os carbapenêmicos de 97,2% e 99,5%, respectivamente. (RHOMBERG; JONES, 2009; TURNER, 2009). Levantamento realizado nos países

latino americanos, em 2011, mostra sensibilidade de 98,9% da *Serratia* aos carbapenêmicos (JONES et al., 2013)**Erro! Fonte de referência não encontrada.**. No entanto, dados mais recentes do boletim epidemiológico paulista de 2017 publicados pelo sistema de vigilância da secretaria de saúde do Estado de São Paulo são menos otimistas, com taxa de resistência de 48% a cefalosporina e 24% a carbapenêmicos para isolados em hemocultura nas UTIs de adultos (ANVISA, 2017)

O primeiro caso de *Serratia* resistente a carbapenêmicos foi notificado na Inglaterra em 1982: o isolado possuía uma carbapenemase cromossômica classe A, a SME-1, capaz de hidrolisar penicilina, cefalosporina de primeira e segunda geração, carbapenêmicos e aztreonam, mas hidrolisam fracamente cefalosporinas de amplo espectro e é inibida por clavulanato (DABOS et al., 2019)**Erro! Fonte de referência não encontrada.**. Outras carbapenemases t ambém foram descritas, como a SFH-I em 2004, também cromossomal, e em 2006 as KPC (CAI et al., 2008). A partir desse período, a publicação de relatos de surtos evidencia a disseminação cepas de *Serratia* resistentes a carbapenêmicos com diferentes tipos de mecanismos como GES-1, VIM, IMP-1 e alteração de porinas (NASTRO et al., 2013; NODARI et al., 2017)

No Brasil, o primeiro caso de *Serratia* resistente à carbapenêmicos foi descrito em 2010 no Rio de Janeiro, por Del peloso e colaboradores (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010), em um caso de ITU com hemocultura positiva; isolado com KPC positivo. A partir de então, surgiram novos relatos, mas sempre contendo pequenas séries de pacientes ou casos isolados, como exemplo temos a casuística de Zavascki e colaboradores (RIBEIRO et al., 2013). Entre junho de 2009 e julho de 2011 eles avaliaram 345 isolados de Enterobacteriaceae com sensibilidade reduzida a carbapenêmicos de 11 hospitais brasileiros e encontraram oito isolados de *S. marcescens,* 2,3% do total, entre as quais existiam três portadoras de KPC. A maior casuística publicada é a de Oliveira e colaboradores (DE OLIVEIRA et al., 2014) que identificaram 14 casos de *SmRc*, identificadas pelo VITEK®, todas com identificação de KPC positiva, realizada por PCR. Recentemente, Tuon e colaboradores (TUON et al., 2017) divulgaram uma casuística de 12 casos de pacientes com isolados de *S. marcescens*, dos quais 6 eram resistentes a carbapenêmicos e KPC positivos.

As *Serratia* são geralmente sensíveis a aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetropim, piperacilina-tazobactan, ticarcilina-clavulonato, cefalosporinas de terceira e quarta

geração, aztreonam e carbapenêmicos. A prescrição de betalactâmicos para tratamento por longos períodos, requer rigor em indicação, devido à presença AmpC cromossomal e risco de perda da sensibilidade ao antimicrobiano. Este cuidado não vale para carbapenêmicos. O uso das outras classes de antimicrobianos não tem regras especiais para o gênero e podem seguir as recomendações gerais para tratamento de infecções em cada sítio (PETERSEN; TISA, 2013).

Com o surgimento da capacidade de aquisição de carbapenemase plasmidiais, em outro momento restrita somente a outras Enterobacteriaceae, as opções terapêuticas estão cada vez mais restritas, ou, no caso das pan-resistentes, não existem. O uso de drogas combinadas tem sido proposto como uma opção terapêutica pela possibilidade de efeito sinérgico entre drogas, mas os resultados ainda não são conclusivos.

A tabela 4 resume as principais carbapenemase que circulam entre as Enterobacteriaceae e suas características.

Tabela 4. Característica das carbapenemases mais comuns das Enterobacteriaceae (LOGAN; WEINSTEIN, 2017)

Classe de Ambler	**Inibidor**	**Gene mais frequente[a]**	**Elemento Genético móvel[b]**	**Sensibilidade aos betalactâmicos[c]**
A	Inibidores comerciais	KPC	IncFIIK$_2$, IncF1A, IncI2, múltiplos tipos; Tn*4401*[d]	Carbapenem (baixo a elevado nível de hidrólise)
		GES	Integrons Class I[e]	Carbapenem (baixo nível de hidrólise)
B	EDTA	VIM	IncN, IncI1, múltiplos tipos; integron classe I	Poupados os monobactâmicos
		IMP	IncL/M, IncA/C, múltiplos tipos; integron classe I	
		NDM	IncA/C, multiplo; IS*Aba125*	
D	NaCl (*in vitro*)	OXA-48 OXA-181	IncL/M, Tn*1999*, IS*1999* ColE plasmídeos, Tn*2013*, IS*Ecp1*	PCN (alto nivel de hidrólise), carbapenêmicos (Baixo nível de hidrólise), poupadas

	cefalosporinas de espectro expandido

Abreviações: CG, grupo clonal; EDTA, ácido ethylenediaminetetraacetico; GES, Guiana extended spectrum; IMP, activo em imipenem; Inc, plasmid incompatibility type; IS, insertion sequence; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; OXA, oxacillinase-type carbapenem-hydrolyzing β-lactamase; PCN, penicillin; VIM, Verona integron-encoded metallo-β-lactamase.

[a] Os genes adquirido mais comuns. Pode variar por região.

[c] Os elementos genéticos móveis mais comuns. Pode variar por região.

[d] O perfil fenotípico pode variar conforme a quantidade e tipos de variantes genéticas presentes.

[e] Frequentemente embebidos em plasmídeos conjugados ou transposons, o que facilita transmissão horizontal.

Porinas

Os antimicrobianos penetram nas células bacterianas pelas porinas, proteínas transmembranares que fazem também transporte de eletrólitos e metabólitos. No caso das bactérias Gram-negativas, as porinas, ou *outer membrane porins* (Omp), são alvos de especial importância dos antimicrobianos. A redução no número dessas proteínas ou sua deleção reduzem a permeabilidade da membrana e a penetração dos antimicrobianos, o que colabora com o aumento da resistência (YE et al., 2018). Há diferentes tipos de porinas, que são classificadas de acordo com sua atividade, estrutura e regulação. A OmpC e a OmpF são duas porinas típicas de Enterobacteriaceae que demandam muito interesse cientifico, justamente por suas funções em transporte de betalactâmicos e capacidade de aumentar a CIM quando em quantidade reduzida (MOYA-TORRES et al., 2014). Estas têm suas expressões reguladas por condições do ambiente, como osmolaridade e temperatura. Suh e colaboradores demonstraram que a perda de ompF em *Serratia* está associada a hiperprodução de AmpC, o que pode provocar a perda da sensibilidade aos carbapenêmicos (SUH et al., 2010). Em seu trabalho, não encontraram correlação entre perda de ompC e sensibilidade a carbapenêmicos pela *Serratia*, resultado também encontrado por Moya-Torres e colaboradores (MOYA-TORRES et al., 2014). Apesar do conhecimento da importância das porinas como mecanismo de resistência para as Enterobacteriaceae, ainda há poucos estudos aprofundando esse tema entre as *Serratia.*

Plasmídeos

Plasmídeos são componentes genéticos não essenciais ao genoma composto por uma fita de DNA externo ao cromossomo, em geral circular e com o tamanho e composição variáveis (DRLICA; GENNARO, 2001). Os plasmídeos que podem ser transferidos entre bactérias de diferentes gêneros são chamados de amplo espectro, ou *broad host ranges* (BHR) (JAIN; SRIVASTAVA, 2013). As carbapenemase, podem localizar-se em plasmídeos de espectro estreito (IncFIIk, ColE, IncX) ou amplo (IncN, IncL/M e IncA/C) (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Já foram descritos em *Serratia* o IncX3 e IncL/M (ADAMCZUK et al., 2015).

O tipo de plasmídeo onde está inserido o gene da betalactamases terá efeito direto na sua capacidade de dispersão horizontal. As carbapenemases mais frequentes são as associadas a plasmídeos de amplo espectro. Um exemplo é a NDM, encontrada principalmente nos plasmídeos IncF e IncA (HUBBARD et al., 2017) e já descrita também em outros como IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 (CARATTOLI, 2013).

Justificativa do estudo

A *Serratia marcescens* é uma espécie para a qual a maior parte do conhecimento é inferência a partir de estudos de outras Enterobacteriaceae. Estudo sobre *SmRc* são ainda mais raros e com casuísticas pequenas. A situação epidemiológica encontrada no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo nos possibilitou analisar uma casuística inédita na literatura de *Serratia Marcescens* resistente a carbapenêmicos e aprofundar o conhecimento sobre mecanismos de resistência nesse patógeno. A situação atual é de aumento de consumo de polimixina, o que pode ser um risco para o aumento da prevalência de infecções por patógenos resistentes a este antimicrobiano, como a *S. marcescens*. Acreditamos que, neste cenário, nosso estudo ganha especial importância.

Objetivo

Objetivo Geral

- Descrever os fatores de risco associados com infecção por *S. marcescens* resistente aos carbapenêmicos

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos.

- Avaliar a clonalidade dos isolados de *S. marcescens*.

-Comparar por meio sequenciamento completo de genoma a ancestralidade de isolados clínicos e ambientais de *S. marcescens.*

Métodos

Tipo de Estudo

Foi realizado estudo de coorte, retrospectivo com levantamento de dados de prontuário e análise microbiológica de isolados de *Serratia marcescens* de banco de cepas.

Período, Local e população.

A inclusão dos casos ocorreu de dezembro de 2008 a julho de 2013 no Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICHC-FMUSP), Brasil. O HC-FMUSP, localizado na cidade de São Paulo, é formado por sete institutos, dois hospitais auxiliares, laboratórios de investigação médica, unidades especializadas e áreas de apoio. É um Complexo Hospitalar, público, universitário, de referência terciária, conveniado ao Sistema Único de Saúde, com aproximadamente 2200 leitos.

Critérios de inclusão

Foram incluídos nesse estudo pacientes internados no ICHC-FMUSP entre janeiro de 2010 e dezembro de 2013 que apresentaram pelo menos uma cultura clínica ou de vigilância positiva para *Serratia marcescens*, colhida pelo menos 48 horas após a internação, identificada pelo método automatizado Vitek II (Biomerieux-França) e com resistência a pelo menos um carbapenêmicos, de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)[48]. Os pacientes foram identificados por meio de vigilância prospectiva realizada pela Sub Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do ICHC (SCCIH ICHC) e pelas notificações de resistência incomum feita pelo Microalerta, email encaminhado pelo Laboratório de Microbiologia da Divisão de Laboratórios Central (DLC) no período entre janeiro de 2010 e dezembro de 2013.

Levantamento de dados clínicos

Os dados foram coletados através da análise de prontuários e preenchimento de uma ficha clínica (Anexo A). Foram levantados dados sobre as seguintes variáveis:

- Sexo
- Idade
- Dias de internação até o isolamento da *Serratia marcescens* em cultura
- Local de internação

- Desfecho na internação
- Uso de dispositivos invasivos como cateter venoso
- Sonda urinária e ventilação mecânica
- Diagnóstico de infeccioso
- Doenças de base
- Realização de procedimentos como diálise, cirurgia, transplante de órgão sólido ou de medula óssea
- Uso de quimioterápicos ou corticoterapia
- Uso de antimicrobianos até 30 dias antes da primeira cultura com *S. marcescens*
- Infecções tratadas nos 30 dias antes da primeira cultura com *S. marcescens*
- Resultados de sensibilidade aos antimicrobianos realizados no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP por método automatizado (VITEK II).
- Antibimicrobianos utilizados no tratamento dos casos de infecção

A identificação de casos de infecção ou colonização assim como os diagnósticos infecciosos foram classificados segundo os critérios da *National Healthcare Safety Network/ Center for Disease Control and Prvention* (NHSN)("CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections in the Acute Care Setting", 2013)

Microrganismos

Os isolados de *Serratia* considerados com perfil de resistência incomum aos carbapenêmicos foram encaminhadas ao Laboratório de Investigação Médica – 49 (LIM-49) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os isolados foram avaliados inicialmente para estudo de surto e depois estocados a -80º C, para preservação celular, em caldo BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 20% de glicerol. Foram colhidas também amostras de ambiente da unidade de terapia intensiva da clínica médica do pronto socorro (UPSM) como parte de investigação de surto naquela unidade. Foram colhidas amostras das torneiras, da régua de gazes e das bancadas de trabalho dos leitos destinados à internação de pacientes da unidade de transplante de medula óssea e dos outros leitos. As amostras foram cultivadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 37° C por

24 horas no laboratório de bacteriologia do Instituto de Medicina Tropical. As cepas foram manipuladas sob normas de biossegurança de nível II.

Aspectos Éticos

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o número (Anexo B).

Não foi necessário aplicação de termo de consentimento, pois se trata de estudo retrospectivo, sem intervenção clínica. A identidade dos participantes foi mantida em sigilo.

O estudo foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Análise dos isolados

Todos os isolados foram novamente identificados por sequenciamento do 16S e também por Maldi-tof (BrukerDaltonik).

Identificação da *Serratia* por método de sequenciamento de 16S

O sequenciamento do 16S foi realizado pela empresa Neoprospecta Microbiome Technologies (Brasil), de acordo com o seguinte protocolo:

Extração de DNA pela técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil). Identificação de bactérias por sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. Preparo das bibliotecas pelo protocolo proprietário (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil). Realizada amplificação com *primers* para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio de um pipeline proprietário (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do

sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil).

Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo

As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas para todos os isolados para Ertapenem, Meropenem e Amicacina pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI, 2016 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2016).

Cada antimicrobiano foi preparado considerando sua potência, assim como o solvente e o diluente apropriado para cada droga utilizada de acordo com as normas do CLSI.

Também avaliamos o perfil de sensibilidade dos isolados a outras classes de antimicrobianos por microdiluição pelo método comercial Sensititre (Sensititer Breakpoint System (SBS), Gibco Diagnostics, Inc., Madison, WI); o preparo das amostras foi realizado conforme orientações do fabricante. Os antimicrobianos testados pelo método comercial foram os seguintes: ETP- Ertapenem, AMI- Amicacina, DOX- Doxiciclina, GEN- Gentamicina, MIN- Minociclina, , TOB- Tobramicina, TGC- Tigeciclina, CIP- Ciprofloxacina, SXT- Trimethoprim / Sulfamethoxazole, LEVO- levofloxacina, AZT- Aztreonam, IMI- Impenem, FEP- Cefepime, MERO- Meropenem, COL- colistina, POL- polimixina, TAZ- Ceftazidima, FOT- Cefotaxima, A/S2- Ampicillin / Sulbactam 2:1, DOR- Doripenem, P/T- Piperacilina / Tazobactam, TIM- - Ticarcilina/ ácido clavulâmico,

Tabela 5. Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2016) para Enterobacteriaceae.

CIM padrão - CLSI 2016

	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC (FDA)	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
S	≤16	≤4	≤4	≤4	≤4	≤2	≤1	≤2/38	≤2	≤4	≤1	≤2	≤1	≤2	≤2	≤4	≤1	≤8/4	≤1	≤16/4	≤16/2
I	32	8	8	8	8	4	2	-	4	8	2	4-8 (SDD)	2	-	-	8	2	16/8	2	32/4-64/4	32/2-64/2
R	≥64	≥16	≥16	≥16	≥16	≥8	≥4	≥4/76	≥8	≥16	≥4	≥16	≥4	≥4	≥4	≥16	≥4	≥32/16	≥4	≥128/4	≥128/2

ATCCCIMStandards - CLSI 2016

***E. coli* – 25922**

	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
Range	0,5-4	0,5-2	0,25-1	0,25-1	0,25-1	0,03-0,25	0,004-0,015	≤0,5/9,5	0,008-0,06	0,06-0,25	0,06-0,25	0,015-0,12	0,008-0,06	0,25-2	0,25-2	0,06-0,5	0,03-0,12	2/1-8/4	0,015-0,06	1/4-4/4	4/2-16/2

***P. aeruginosa* - 27853**

	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
Range	1-4	-	0,5-1	-	0,25-1	-	0,25-1	8/152-32/608	0,5-4	2-8	1-4	0,5-4	0,25-1	0,5-4	0,5-2	1-4	8-32	-	0,12-0,5	1/4-8/4	8/2-32/2

Pulsed-Field Gel Eletrophoresis (PFGE)

A eletroforese convencional de moléculas de DNA é realizada aplicando-se amostras de preparados de DNA em uma matriz sólida de agarose que migram através do gel sob campo elétrico estático (SEIFERT et al., 2005). Foi utilizada a enzima de restrição Spe I (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e incubada a 37º C por 5 minutos. Os perfis eletroforéticos foram gerados utilizando o software Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths). Os fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso Lambda Maker. Tolerância de 1.5% e otimização de 0.5% foram utilizadas para comparação entre diferentes géis. O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade.

Para definir os perfis clonais e subtipos encontrados, três níveis de cut off foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes perfis. Os subtipos foram definidos a partir dos perfis com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos (DURMAZ et al., 2009)

Tabela 6. Condições de corrida estabelecidas para PFGE de *S. marcescens* em CHEF DRIII – BioRad. FMUSP, São Paulo.

Agarose (%)	Switch Time (s)	Volts/cm	Temperatura	Tempo de corrida	Fragmentos (Kb)
1	5.0 – 60	6	13º C	23 horas	50 – 450

Pesquisa de carbapenemases por Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para todos os isolados foi feito PCR para detecção de gene codificador de KPC, OXA-48 e NDM. Foi utilizado GenoCIMPrep™ and Tissue DNA Isolation Kit – Amersham Pharmacia Biotech, seguindo as orientações do fabricante para extração de DNA de bactérias Gram-negativas. Os *primers* estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. *Primers* utilizados para detecção de carbapenemase por PCR

Carbapenemase	*bla*$_{KPC}$	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	Bradford et al., 2004 (BRADFORD et al., 2004)
Carbapenemase	*bla*$_{NDM-1}$	GGCGGAATGGCTCATCACGA CGCAACACAGCCTGACTTTC	287	Chen et al., 2011 (CHEN et al., 2011)
Carbapenemase	*bla*$_{OXA-48-F}$ *bla*$_{OXA-48-R}$	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	177	Monteiro et al, 2012 (MONTEIRO et al., 2012)

Cada reação foi realizada com controle interno positivo, para o determinado gene, e controle negativo. As reações de amplificação ocorreram em termociclador Mastercycler Nexus GSX 1. Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos a eletroforese (gel de agarose 1%, coloração com Syber Safer) e foto-documentado com Alpha Innotech – AlphaImager.

Identificação dos isolados pelo método de Mandi-Tof

As amostras foram preparadas com o protocolo de Kuhnert e colaboradores (KUHNERT et al., 2012) para extração de proteína. Uma alíquota de 1ul foi colocada numa matriz de aço inox para leitura por espectrofotometria, sob uma matriz de ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico. A leitura pelo MALDI-TOF MS foi feita pelo espectrofotômetro de massa Microflex™ (BrukerDaltonik) do setor de microbiologia da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Cada amostra é colocada em dois poços da matriz de aço e são feitas duas leituras. A captura dos espectros proteicos foi feita pelo programa FlexControl™ (BrukerDaltonik) pelo método MTB_autoX.

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (BrukerDaltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. A identificação da *Serratia* foi confirmada com escores a partir de 1700.

Sequenciamento completo do genoma

Para o SCG foram selecionados isolados de pacientes com infecção. O sequenciamento do DNA foi feito a partir dos produtos de PCR, utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia *GE Healthcare*. As reações

de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo SequenaseTM II DNA Polimerase) código US81090, As sequências serão analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3,12, A sequência genética foi comparada com banco de dados disponível na internet (BLAST – http://www.ncbi.nlm.nhi.gov/blast/).

Sequenciamento do genoma total bacteriano e Análise Bioinformática

As amostras de *S. marcescens* foram submetidas ao sequenciamento do genoma total pela metodologia de MiSeq Illumina^{TM} da Life Technologies. O método consiste inicialmente de formação de uma biblioteca de fragmentos de DNA total (300 pb) e amplificação do DNA por PCR em ponte (bridge PCR) de segmentos pareados de leitura (*paired end reads*). A qualidade dos arquivos gerados é avaliada com o uso dos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33 e o genoma montado de novo usando-se o programa Velvet v. 1.2. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1 usando-se uma cepa referência de *S. marcescens*. O genoma foi anotado usando-se o programa Prokka v. 1.11. Com o DNA sequenciado foram investigados genes codificadores de enzimas responsáveis pela resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos com as seguintes ferramentas: a curadoria dos genes codificadores de proteínas foi feita com o programa Artemis 16.0.0 (RUTHERFORD et al., 2000). Os genes de resistência foram pesquisados nas plataformas ResFinder (ZANKARI et al., 2012), Virulence Factors Database (“VFDB: Virulence Factors of Bacterial Pathogens”,) e BLAST (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool”,). Plasmídeos foram avaliados com a ferramenta PlasmidFinder (“CGE Server”,). A filogenia foi inferida usando o pipeline REALPHY do Instituto Suíço de Bioinformática (“REALPHY Online Tool”,). Todas os genomas foram alinhados com o genoma de referência AM180355.1, disponível no site do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (“National Center for Biotechnology Information”,).

Com os genomas montados, foi construído uma árvore filogenética a partir da análise do polimorfismo dos nucleotídeos (*single nucleotide polymorphism* – SNP). Analisamos a filogenia e distância no tempo de um alinhamento contendo 282 genes de cada isolado usando BEAST v2.5.2 (BOUCKAERT et al., 2014) assumindo o modelo de substituição

HKY com 4 categorias discretas de Γ, e a constante do modelo populacional do processo de coalescência de cada gene (HO; SHAPIRO, 2011; RAMBAUT et al., 2018). Além dos 23 isolados sequenciados em nosso trabalho, foram incluídos na análise 33 isolados do GenBank ("Home - Nucleotide - NCBI",) para construção da árvore. Cada gene foi tratado que foi tratado como partições individuais para seleção de modelo de local e partições vinculadas para o modelo de árvore e relógio.

Um relógio molecular foi construído com a intenção de avaliar a relação de ancestralidade das amostras e tempo decorrido desde o surgimento de cada clado a partir do ancestral comum. O relógio foi feito sob um relógio estrito (CHALLAGUNDLA et al., 2018) e calibramos a árvore usando datas de ponta (DRUMMOND et al., 2006). Combinamos duas execuções independentes de Monte Carlo em Cadeia de Markov- cada cadeia foi operada por 200 milhões de gerações- descartando os primeiros 20% como queima. Inspecionamos essas cadeias usando o Tracer v1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018) e obtivemos uma árvore final calculando a árvore de credibilidade máxima do clado usando o TreeAnnotator v2.5 ("TreeAnnotator | BEAST Documentation",). Para viabilizar a construção da árvore, foram incluídas 33 sequências de genomas de *Serratia* de amostras clínicas e ambientais do GenBank. Selecionamos amostras que tivessem informações com alguma semelhança às nossas, como por exemplo, amostras de ambiente urbano – como impressora – e amostras clínicas.

Análise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva das características dos pacientes e das infecções causadas por *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos, bem como dos tratamentos utilizados, apresentando-se a freqüência para variáveis categóricas e mediana e intervalo para variáveis contínuas. Também foi realizada a análise descritiva para o grupo de pacientes de transplante de medula óssea.

Os pacientes foram avaliados conforme grupos de fatores de exposição e comparados para o desfecho "infecção". Para as variáveis dicotômicas, foi calculado o risco relativo, seu intervalo de 95% de confiança e foi utilizado o teste de qui-quadrado. Para as variáveis contínuas foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível da significância adotado foi de 0,05. As variáveis que apresentaram $p \leq 0{,}25$ foram

incluídas na análise multivariada, por regressão logística múltipla utilizando o método de *stepwise forward*. Para armazenamento do banco de dados foi utilizado o programa Microsoft-Excel-2018 e para análise estatística o programa Epi.Info 7.

Resultados

Dados epidemiológicos

Foram incluídos 63 pacientes colonizados ou infectados por *S. marcescens* resistente a pelo menos um carbapenêmico, segundo laudo fornecido pelo laboratório de rotina do hospital. O número de homens foi superior e a idade média foi próxima de 50 anos. O cálculo de Apache II apontou para um risco de morte médio de 25% - o óbito observado foi de 48%. As duas UTIs referência para o pronto socorro (PS), UTI da clínica médica do PS (UPSM) e unidade de terapia intensiva da clínica cirúrgica do PS (UPSC) foram as que tiveram o maior número de casos, seguidos pela enfermaria de transplante de medula óssea e doenças hematológicas: total de 42 pacientes nas 3 unidades. Os tumores hematológicos foram a doença de base mais frequente, mas as patologias cirúrgicas superaram as clínicas na soma total: urgências cirúrgicas, emergências neurocirúrgicas, trauma e transplante de órgão totalizaram 32 pacientes. Insuficiência renal foi a comorbidade mais frequente, seguida de hipertensão e diabetes. (tabela 8)

Os antimicrobianos foram os medicamentos mais utilizados e cirurgia o procedimento mais realizado. O uso de dispositivos invasivos está apresentado na forma de cálculo de dias de uso de dispositivo invasivo por 100 pacientes dia. Cateter venoso central foi o dispositivo mais usado.

O resumo dos dados epidemiológicos e demográficos dos 63 pacientes está apresentado na tabela 8.

Tabela 8: Dados epidemiológicos e demográficos de 63 pacientes infectados ou colonizados por *SmRc* no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

Variável		Resultado
Sexo (n): Feminino/Masculina		24/39
Idade: mediana (mín.- máx.)		49,5 (14-88)
Tempo de internação (dias): mediana (mín.- máx.)		37 (6-125)
Dias até o isolamento da *SmRc*: mediana (mín.- máx.)		23 (2-83)
Apache: mediana (mín.- máx.) *		17 (7- 34)
Unidade de Internação (n)	UPSC	17
	UPSM	16
	ETMO	9

	UTI_Cirúrgica	5
	EMIN	4
	EPSM	4
	E_Clínica	3
	E_Cirurgica	3
	E_TR	2
Doença de base (n)	Descompensação de patologia clínica	12
	Peritonite, aids, insuficiência cardíaca, cirrose, Steven-Johnson, LES, Colite ulcerativa, ITU, meningite tuberculosa	
	Doenças hematológicas	2
	Tumores hematológicos	15
	Emergências neucirúrgicas	12
	Transplante de órgão sólido	3
	Tumor sólido	2
	Urgências cirúrgicas	10
	Trauma	6
	Desconhecida	1
Comorbidades (n)	Hipertensão	12
	Diabetes	8
	IRC	5
	IRA	12
	Hepatopatia	7
Pacientes que tiveram procedimentos realizados ** (n)	Quimioterapia	13
	Corticoterapia	23
	Nutrição parenteral	3
	Radioterapia	0
	Cirurgia	27
	Cirurgia urgência	22
	Antimicrobianos para tratamento de infecção não causada por *SmRc*	39
Densidade de uso de dispositivos invasivos ** (dispositivo/paciente dia X100)	Cateter	84
	Sonda urinária	58
	Ventilação mecânica	36,5
Óbitos na internação: número (%)		30 (48%)
Material do isolamento da *SmRc*	Sangue	13
	Lavado broncoalveolar	2
	Cateter central	10
	Vigilância (swab ou fezes)	26
	Aspirado traqueal	1
	Urina	10
	Ferida	1
Diagnóstico relacionado à *SmRc*	Infecção de corrente sanguínea	13
	Infecção relacionada a cateter	1
	Colonização	43

	Pneumonia	2
	Infecção de sítio cirúrgico	1
	Infecção de urina	3

Legenda: UPSC- UTI do pronto socorro cirúrgico, UPSM- UTI do pronto socorro clínico, ETMO- enfermaria de transplante de medula óssea, UTI_Cirúrgica - UTI das clínicas cirúrgicas, EMIN- enfermaria de moléstias infecciosas, EPSM- enfermaria do pronto socorro clínico, E_Clínica- enfermaria da clínica médica, E_Cirúrgica- enfermaria de clínica cirúrgica, E_TR- enfermaria de transplante renal.

IRC- insuficiência renal crônica, IRA- insuficiência renal aguda

*56 pacientes com dados disponíveis para cálculo de Apache

** até 30 dias antes do isolamento da *SmRc*

A tabela 9 mostra os dados clínico-demográficas dos pacientes com infecção ou colonização por *SmRc*.

Tabela 9. Características clínico-demográficas de 63 pacientes com infecção ou colonização por *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

n	Paciente	Sexo	Idade	Clínica	Desfecho clínico	Data *SmRc*	Tipo amostra	Diagnóstico	Patologia de base	Neutropênico*	TCTH
1	LCG	Feminino	47	UPSM	Alta	abr-10	Urina	ITU	LNH	Não	Autológo
2	TCM	Masculino	24	ETMO	Óbito	set-10	Sangue	ICS	LNH	Sim	Alogênico
3	DT	Masculino	57	E_TR	Óbito	out-10	Sangue	ICS	LMA	Não	Alogênico
4	ABO	Feminino	65	UPSM	Alta	nov-10	Cateter central	Col.	LMC		
5	ADS	Masculino	73	UPSC	Alta	nov-10	Ferida	Col.	Trauma		
6	FS	Feminino	14	UPSM	Alta	nov-10	Cateter central	IC	ITU		
7	CS	Feminino	73	E_Cirúrgica	Óbito	dez-10	Sangue	ICS	DIA		
8	TJS	Masculino	59	UTI_Cirúrgica	Óbito	dez-10	Cateter central	Col.	Tx hepático		
9	NG	Masculino	55	ETMO	Óbito	jun-11	Urina	Col.	LMA	Não	Alogênico
10	MZ	Feminino	61	UPSM	Alta	ago-11	Urina	Col.	MM		
11	DOS	Masculino	21	UPSM	Óbito	set-11	LBA	BCP	Mielodisplasia		
12	LCL	Feminino	52	UPSM	Alta	set-11	Swab vigilância	Col.	Distonia aguda		
13	BVS	Feminino	84	E_Clínica	Alta	set-11	Urina	Col.	LNH		
14	MENS	Feminino	67	UPSC	Alta	out-11	Aspirado traqueal	Col.	Trauma		
15	ALS	Masculino	61	UPSC	Alta	jan-12	Swab vigilância	Col.	Trauma		
16	ESL	Feminino	57	UPSM	Alta	fev-12	Fezes - vigilância	Col.	RCU		
17	MASP	Masculino	58	EPSM	Óbito	fev-12	LBA	BCP	AVC		
18	ERHS	Feminino	37	E_TR	Alta	fev-12	Urina	ITU	Tx renal		

n	Paciente	Sexo	Idade	Clínica	Desfecho clínico	Data *SmRc*	Tipo amostra	Diagnóstico	Patologia de base	Neutropênico*	TCTH
19	MMM	Masculino	17	UTI_Cirúrgica	Alta	abr-12	Sangue	ICS	Trauma		
20	AAV	Masculino	36	UPSC	Alta	abr-12	Ferida	ISC	Trauma		
21	FDC	Feminino	29	UPSC	Alta	abr-12	Cateter central	Col.	AVC		
22	OL	Masculino	69	UPSC	Óbito	abr-12	Swab vigilância	Col.	Tu intestinal		
23	GM	Masculino	66	UPSM	Alta	mai-12	Sangue	ICS	AVC		
24	AZC	Feminino	27	E_Clínica	Alta	jun-12	Urina	Col.	Tuberculous meningitis		
25	MMO	Feminino	34	UPSC	Alta	jun-12	Fezes - vigilância	Col.	AVC		
26	LAM	Masculino	62	ETMO	Óbito	jun-12	Swab vigilância	Col.	Linfoma	Sim	Autólogo
27	CAF	Feminino	20	UPSC	Alta	jul-12	Swab vigilância	Col.	Trauma		
28	AJM	Masculino	50	UPSM	Óbito	jul-12	Urina	Col.	Cirrose		
29	TRO	Masculino	33	UPSM	Óbito	jul-12	Swab vigilância	Col.	Steven-Johnson, LES		
30	JVL	Masculino	26	ETMO	Óbito	ago-12	Urina	Col.	LLA	Sim	Alogênico
31	LBC	Feminino	65	ETMO	Alta	ago-12	Sangue	ICS	LNH	Sim	Autólogo
32	CAL	Masculino	45	UPSM	Alta	ago-12	Swab vigilância	Col.	SAF		
33	EAS	Masculino	63	UTI_Cirúrgica	Alta	ago-12	Sangue	Col.	Peritonite		
34	MJC	Feminino	56	EPSM	Óbito	ago-12	Sangue	ICS	AVC		
35	DSS	Feminino	22	UPSM	Óbito	set-12	Sangue	ICS	LES		
36	PCM	MASCULINO	20	UTI_Cirúrgica	Alta	**out-12**	Cateter central	Col.	Pancreatite		
37	RNR	Masculino	35	ETMO	Alta	out-12	Swab vigilância	Col.	LMA	Sim	Alogênico
38	WLB	Masculino	42	ETMO	Óbito	nov-12	Cateter central	ICS	LMA	Sim	Alogênico
39	FAZ	Masculino	62	UPSM	Alta	nov-12	Swab vigilância	Col.	Timoma		

n	Paciente	Sexo	Idade	Clínica	Desfecho clínico	Data *SmRc*	Tipo amostra	Diagnóstico	Patologia de base	Neutropênico*	TCTH
40	CFA	Feminino	64	EMIN	Óbito	nov-12	Swab vigilância	Col.	Aids		
41	FLR	Feminino	36	UPSM	Óbito	nov-12	Sangue	ICS	LH	Sim	Autólogo
42	HIS	Masculino	73	UPSC	Óbito	dez-12	Cateter central	Col.	IC		
43	MY	Masculino	41	UPSC	Alta	jan-13	Swab vigilância	Col.	AVC		
44	SAA	Feminino	35	ETMO	Alta	jan-13	Swab vigilância	Col.	Anemia aplástica		
45	VVP	Masculino	72	UPSM	Alta	jan-13	Swab vigilância	Col.	AVC		
46	SDO	Masculino	35	UPSM	Óbito	jan-13	Swab vigilância	Col.	LNH		
47	OSP	Feminino	88	EPSM	Óbito	jan-13	Sangue	ICS	Colangite		
48	ILA	Feminino		UTI_Cirúrgica	Óbito	abr-13	Cateter central	Col.	DIA		
49	JCS	Masculino	79	UPSC	Óbito	mai-13	Cateter central	Col.	Tu intestinal		
50	MJB	Feminino		E_Cirúrgica	Óbito	mai-12	Sangue	ICS	Tx hepático		
51	BFA	Masculino	27	E_Clínica	Alta	mai-13	Swab vigilância	Col.	Abcesso abdominal		
52	JMC	Masculino	48	UPSC	Alta	mai-13	Swab vigilância	Col.	AVC		
53	LCA	Feminino	82	UPSC	Óbito	jun-13	Sangue	ICS	Fasceíte		
54	CCC	Masculino	22	E_Cirúrgica	Alta	jul-13	Cateter central	Col.	Tu cerebral		
55	RG	Masculino	54	EMIN	Óbito	jul-13	Swab vigilância	Col.	Aids		
56	WRO	Masculino	32	UPSC	Alta	jul-13	Swab vigilância	Col.	Trauma		
57	DGS	Masculino	20	UPSC	Alta	ago-13	Swab vigilância	Col.	Trauma		
58	EFS	Masculino	57	EMIN	Alta	ago-13	Urina	ITU	Espondilodiscite		
59	AFS	Masculino	59	EMIN	Óbito	ago-13	Swab vigilância	Col.			

n	Paciente	Sexo	Idade	Clínica	Desfecho clínico	Data *SmRc*	Tipo amostra	Diagnóstico	Patologia de base	Neutropênico*	TCTH
60	VPF	Masculino	57	UPSC	Óbito	out-13	Swab vigilância	Col.	AVC		
61	FFQ	Masculino	83	UPSC	Óbito	out-13	Swab vigilância	Col.	Trauma		
62	JL	Masculino	54	ETMO	Óbito	out-13	Swab vigilância	Col.	LMA	Sim	Alogênico
63	APM	Masculino	60	EPSM	Óbito	out-13	Swab vigilância	Col.	Trauma		

* Dado levantado nos últimos 30 dias antes do isolamento da SmRc

ICS- Infecção de Corrente sanguínea, IC- Infecção de cateter, ISC- Infecção de sítio cirúrgico ITU- Infecção de trato urinário, Col.- Colonização, BCP- broncopneumonia

EPSM- Enfermaria do pronto socorro da clínica médica, UPSM- UTI do pronto socorro da clínica médica, ETMO- Enfermaria do transplante de medula óssea, UPSC- UTI do pronto socorro da cirurgia, EPSC- Enfermaria do PS da cirurgia, UCH- UTI da cirurgia do fígado, ECMG- Enfermaria clínica de gastroenterologia, ECCG- Enfermaria cirúrgica de gastroenterologia, UCC- UTI cirúrgica, PS neuro- PS da neurologia clínica, UARR- UTI de recuperação anestésica, EMIN- Enfermaria de moléstias infecciosas, UMIN- UTI de moléstias infecciosas

LBA- Lavado broncoalveolar,

DCJ- Doença de Creutzfeldt-Jakob, LNH- Linfoma náo Hodgkin, LMA- Leucemia Mielóide Aguda, LMC- Leucemia mieloide crônica, TCE- trauma crânio encefálico, MM- Mieloma múltiplo, SMD- Síndrome mielodisplásica, RCU- Retocolite ulcerativa, AVC- acidente vascular cerebral, LLA- Leucemia linfoide aguda, SAF- Síndrome anticorpo antifosfolípide, LH- Linfoma de Hodgkin, LES- Lupus eritematoso sistêmico, IC- Insuficiência Cardíaca, Tx - transplante, DIA- doença inflamatória abdominal aguda

CVC- Cateter venoso central de curta duração, CI- Cateter implantável, SVD- Sonda vesical de demora, VM- Ventilação mecânica

Entre os 11 pacientes do transplante de medula óssea houve 7 pacientes transplantados alogênico e 4 de autólogos. A mortalidade foi de 63%: 85% entre os pacientes de transplante alogênico e 25% entre os de transplante autólogo. Infecção de corrente sanguínea foi o diagnóstico mais frequente. A tabela 10 mostra os dados clínicos dos pacientes de submetidos a TCTH

Tabela 10. Características clínico-demográficas de 11 pacientes submetidos a TCTH com infecção ou colonização por *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013.

Paciente	Desfecho	Data	Material de cultura	Diagnóstico infeccioso (relacionado à *SmRc*)	Patologia de base	Tipo de TCTH	Neutropenia*	Mucosite	Dias de TCTH na data da cultura
LCG	Alta	abr-10	Urina	ITU	Linfoma não Hodgkin	Autólogo	Não	Não	11
TCM	Óbito	out-10	Sangue	ICS	Linfoma não Hodgkin	Alogênico	Sim	Sim	51
DT	Óbito	out-10	Sangue	ICS	Leucemia mielóide aguda	Alogênico	Não	Sim	77
NG	Óbito	jun-11	Urina	Colonização	Leucemia mielóide aguda	Alogênico	Não	Sim	44
LAM	Alta	jun-12	Swab	Colonização	Linfoma não Hodgkin	Autólogo	Sim	Sim	32
JVL	Óbito	ago-12	Urina	Colonização	Leucemia linfóide aguda	Alogênico	Sim	Não	0
LBC	Alta	ago-12	Sangue	ICS	Linfoma não Hodgkin	Autólogo	Sim	Sim	25
RNRG	Alta	out-12	Swab	Colonização	Leucemia mielóide aguda	Alogênico	Sim	Sim	39
WLBM	Óbito	nov-12	Cateter central	ICS	Leucemia mielóide aguda	Alogênico	Sim	Sim	Condicionamento
FLR	Óbito	nov-12	Sangue	ICS	Linfoma de Hodgkin	Autólogo	Sim	Não	13

Paciente	Desfecho	Data	Material de cultura	Diagnóstico infeccioso (relacionado à *SmRc*)	Patologia de base	Tipo de TCTH	Neutropenia*	Mucosite	Dias de TCTH na data da cultura
JL	Óbito	out-13	Swab	Colonização	Leucemia mielóide aguda	Alogênico	Sim	Sim	390

* Dado levantado nos últimos 30 dias antes do isolamento da SmRc

ICS- Infecção de Corrente sanguínea, ITU- Infecção de trato urinário

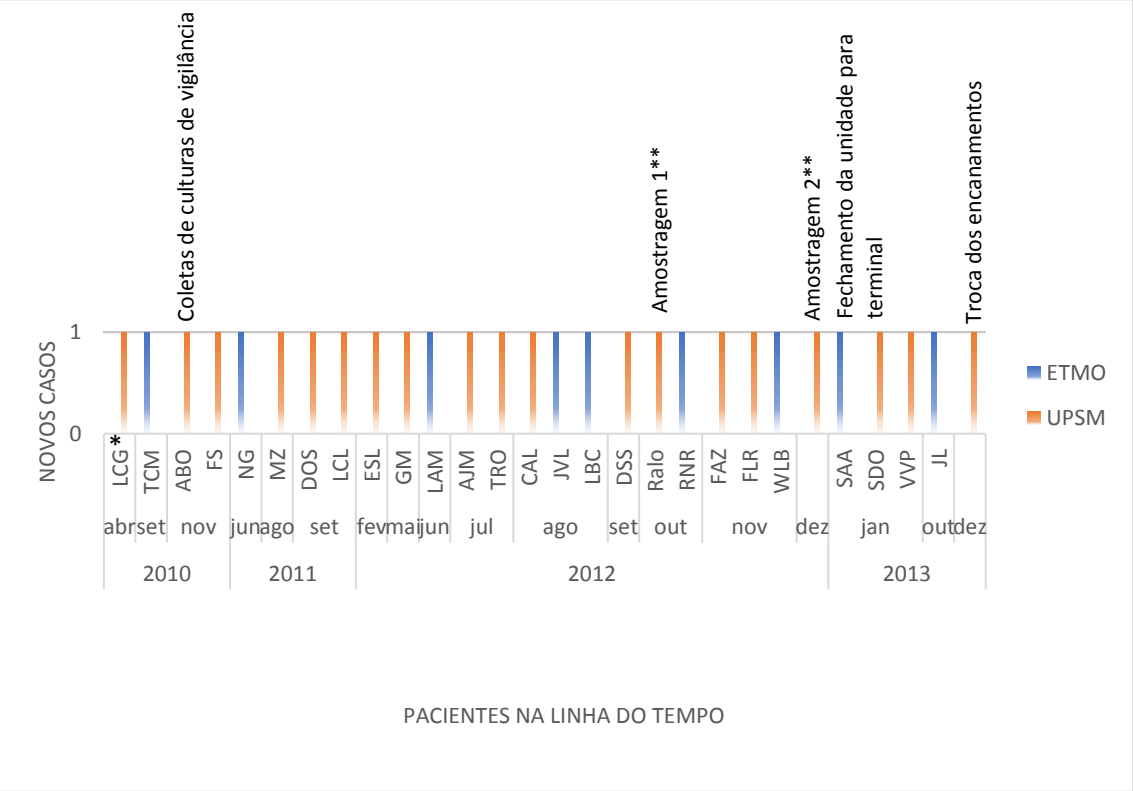
Descrição do surto e medidas de controle

Durante o período de 3 anos do estudo (abril de 2010 a dezembro de 2013), foi evidenciado um surto de *SmRc* entre os pacientes submetidos a TCTH e da unidade UPSM. Foi realizada uma investigação inicial de busca da fonte, que foi inconclusiva, e implantação de um pacote de medidas de controle de disseminação de bactérias multirresistentes nas unidades. As medidas incluíram: coleta de cultura de vigilância dos pacientes na admissão e semanalmente até a alta para identificação de colonizados. Os pacientes infectados e colonizados eram colocados em isolamento de contato: na UPSM o isolamento era apenas no leito, pois não havia quarto privativo, e os quartos tinham entre dois e quatro leitos cada. O quarto destinado aos pacientes submetidos a TCTH era para dois pacientes. A rotina de coleta de culturas de vigilância era feita através de swab retal ou perianal ou de fezes, no caso dos neutropênicos. Também foram feitas medidas de educação comportamental quando ao uso de aventais e luvas e higiene das mãos. Apesar das medidas, não houve redução do número de casos e, em outubro de 2012, optou-se por coleta de amostras de ambiente. Foram colhidas 19 amostras do quarto 4150, que continha dois leitos de referência para o TMO, e 14 amostras do quarto 4154, contíguo, onde havia uma maior frequência de casos. Foram usadas Placas Rodac em 9 amostras, Petrifilm em 9 amostras e swab no restante e a sensibilidade a carbapenêmicos foi testada por disco difusão. Os locais amostrados e os resultados das culturas de ambiente estão na tabela 11. Foi isolado *SmRc* em duas pias do quarto 4151, uma destinada à higiene das mãos, na entrada do quarto, e outra interna, numa sala de uso da enfermagem. Foi feito o bloqueio da unidade para esvaziamento completo da UTI e realização de limpeza terminal. No mês de dezembro de 2012, foi feita recoleta das amostras de ambiente e novamente foi isolado SmRc na pia interna do quarto. Não foram tomadas novas medidas de imediato, além das já instituídas, mas no final de 2013 optou-se pela troca das torneiras do quarto 4151. O surto foi considerado encerrado após 6 meses sem novos casos o que ocorreu em abril de 2014.

Tabela 11: Resultados da pesquisa de *SmRc* em ambiente na UPSM no ICHC-FMUSP, em outubro de 2012

Quarto	Local de coleta	Coleta out/2012	Coleta out/2013
Quarto 4150	Bancada de cabeceira da cama	Negativo	Negativo
(TMO)	Cuba da pia de higiene de mãos	Negativo	Negativo
	Bancada de preparo de medicação	Negativo	Negativo
	Painel de gases	Negativo	Negativo
	Monitor	Negativo	Negativo
	Barra da cama	Negativo	Negativo
	Porta papel toalha	Negativo	Negativo
	Saboneteira	Negativo	Negativo
	Maçaneta de armário	Negativo	Negativo
	Ralo da pia de higiene de mãos	Negativo	Negativo
	Torneira da pia de higiene de mãos	Negativo	Negativo
Quarto 4154	Bancada de cabeceira da cama	Negativo	Negativo
	Cuba da pia de higiene de mãos	Negativo	Negativo
	Dispensador de álcool gel	Negativo	Negativo
	Painel de gases	Negativo	Negativo
	Barra da cama	Negativo	Negativo
	Cuba da pia de higiene de mãos (da entrada)	Negativo	Negativo
	Ralo da pia de higiene de mãos (da entrada)	*S. marcescens* IMI e MER S	Negativo
	Ralo (pia interna)	*SmRc*	*SmRc*
	Torneira da pia de higiene de mãos (da entrada)	*SmRc*	Negativo
	Torneira de pia (interna)	BGN não fermentador	Negativo

Figura 2: Surto de infecção e colonização por *Serratia marcescens* nas unidades de UPSM e ETMO, no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo, de abril de 2010 a dezembro de 2013



* Pacientes

** Amostras disponíveis para análise

*** Amostras não disponíveis

ETMO- Enfermaria de transplante de medula óssea

UPSM- UTI do pronto socorro de clínica médica

Análise dos dados

As análises bivariada e multivariada estão detalhadas na tabela 12. Na análise bivariada foi evidenciado que realização de TCTH é fator de risco para infecção por SmRc, assim como uso de cateter central e uso de polimixina nos 30 dias que antecederam o isolamento da SmRc. Os fatores de risco com valor de $p \leq 0,25$ na análise bivariada foram colocados no modelo de regressão logística usando o *stepwise foraward*. Foram fatores de risco independentes para infecção por SmRc o uso de cateter venoso central, uso de dois cateteres (pacientes em diálise) e uso de polimixina. A tabela 10 mostra os resultados das análises bivariada e multivariada.

Tabela 12: Comparação entre as proporções das características clínicas e epidemiológicas entre pacientes com e sem infecção por *SmRc* no ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 2010 a 2013

Fator de risco	N infecções / N total a – média/ desvio padrão	RR (CI 95%)	p	Regressão logística ** Odds Ratio (95%-C. I); valor de p
Sexo	11/24 (M) 9/30 (H)		0,538	
Idade [a]	47,26/22,2 (I) 50,6/ 18,5 (C)		0,108	
Insuficiência renal aguda	7/12	0,7 (0,47 – 1,06)	**0,051**	4,49 (0,089 – 22,44); 0,06
Insuficiência renal crônica	2/4	1,74 (0,87 - 3,45)	0,407	
Diabetes	4/8	1,36 (0,50 - 3,68)	0,422	
Hepatopatia	3/7	1,38 (0,68 - 2,83)	0,676	
Hipertensão	5/12	1,19 (0,61 - 2,32)	0,511	
Tumor sólido	0/3	1,18 (0,70 - 1,97)	0,544	
Trauma	3/8	0,65 (0,54 - 0,79)	0,539	
Tumor hematológico	7/16	1,07 (0,60-1,90)	0,233	
Transplante de órgão sólido	2/3	1,25 (0,78 - 2,0)	0,234	
Transplante de medula óssea	7/11	2,2 (0,91 - 5,4)	**0,046**	2,29 (0,47 – 12,2); P=0,292
Cateter venoso central*	18/48	1,84 (0,84 - 4)	**0,049**	4,68 (0,46 – 47,42) P= 0,19
Uso de cateter vesical de demora*	12/35	1,05 (0,74 - 1,5)	0,496	
Ventilação mecânica *	10/30	1,01 (0,71 - 1,44)	0,572	
Infecção *	15/38	1,81 (0,76 - 4,33)	0,124	
Uso de betalactâmicos*	10/32	0,98 (0,70-1,38)	0,573	
Uso de polimixina *	12/22	1,74 (1,08-2,84)	**0,008**	3,72 (1,01-13,78) P= 0,0485
Uso de carbapenêmicos *	13/35	1,16 (0,823-1,642)	0,287	
Cirurgia *	8/27	0,91 (0,65 - 1,3)	0,425	

*trinta dias antes do isolamento da *S. marcescens* resistente a carbapenêmicos

** Teste qui-quadrado, considerando-se o nível de significância de 5% (a=0,05).

*** Pacientes com infecção

M- Mulheres, H- Homens

I- Infectados, C- Colonizados

Características microbiológicas dos isolados

Do banco de cepas, foram avaliadas 70 amostras, das quais 42 tiveram a identificação de *Serratia marcescens* confirmada pelo método de sequenciamento de 16Sr RNA e/ou por MALDI-TOF. As 42 amostras são compostas por 39 isolados de amostras clínicas de trinta e cinco pacientes e três amostras ambientais.

Dos 42 isolados, 22 eram de infecção, 17 de colonização e 3 ambientais. O isolado 1763 (Tabela 10) pertence a uma paciente com abscesso abdominal diagnosticado 1 ano após uma cirurgia de ressecção tumoral realizada no ICHC- a paciente não foi incluída na análise epidemiológica pois não tinha critério para infecção hospitalar, mas foi caracterizada microbiológica pelo interesse na comparação dessa cepa com as do estudo. As amostras ambientais incluídas eram de duas pias e um ralo da UPSM e foram colhidas durante a investigação de surto descrita acima.

A CIM dos isolados de *Serratia marcescens* estão detalhados na tabela 13. A resistência a ertapenem foi confirmada em 90% das amostras (38/42), duas foram considerados com resistência intermediária e duas foram sensíveis. Para os outros antimicrobianos testados, a resistência entre as amostras foi de: 83% para meropenem (35/42), 45% para amicacina (19/42), 33% para gentamicina, 86% para minociclina (12/14), 100% para tobramicina (14/14), 14% para tigeciclina (2/14), 100% para ciprofloxacina (14/14), 100% para sulfametoxazol (8/13), 61% para levofloxacina (12/14), 100% para azitromicina (14/14), 90% para imipenem (10/11), 75% para cefepima (9/12), 93% para polimixina (13/14)

A análise da diversidade clonal das 42 amostras foi avaliada por PFGE e a análise molecular realizada através de SCG (figura 1). Observados a presença de 5 clones com

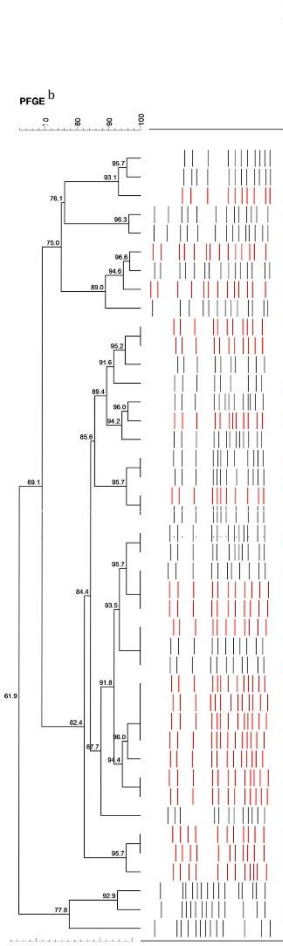
pelo menos 80% de semelhança entre isolados. O Clone D foi o mais frequente durante o período do estudo, com 71% das amostras pertentes a esse clone. Foram identificados genes de resistência para aminoglicosídeos em todas as amostras analisadas por SCG (23/23); os mais comuns foram aac(6')-Ib (23/23), ant(2'')-Ia (19/23) e aph(3')-Via (16/23) .

A betalactamase mais frequente foi a KPC, presente em 35/42 isolados. Na confirmação da CIM pelos testes realizados, dois isolados foram sensíveis ao ertapenem e ao meropenem (1511 e 1402) e outras duas foram sensíveis ao meropenem e intermediárias ao ertapenem (1058, IMI sensível e 1763, IMI resistente). Desses isolados sensíveis e/ou intermediários a carbapenêmicos, o 1058 e o 1763 são portadores de KPC e a 1511 e 1402 não têm carbapenemases identificadas. Os isolados 1509, 1510 e 1511 pertencem todos à mesma paciente FLR, de 26 anos, que foi internada para um transplante autólogo para tratamento de Linfoma de Hodgkin. Ela vinha em uso de meropenem (11 dias), amicacina (6 das), polimixina (6 dias) e tigecicline (6 dias) para tratamento de uma infecção de corrente sanguínea por *Klebsiella pneumoniae* quando foi identificado o primeiro isolado de *SmRc* em uma cultura de vigilância. Após essa primeira cultura, ela teve outras 6 amostras clinicas (4 de sangue) positivas para *SmCr* nos próximos 10 dias. No 9º dia após a *SmRc*, foi isolada *S. marcescens* sensível a carbapenêmicos de uma amostra de sangue e no 11º dia a paciente faleceu em decorrência de um quadro séptico. O teste de Hodge dessas amostras foi positivo para as cepas resistentes a carbapenêmicos e negativo para o isolado sensível, compatível com o resultado do Vitek-2.

O plasmídeo IncA/C2 (18) foi o mais prevalente, seguido por IncFIB(K), IncFII e IncN (16). Os resultados das análises moleculares e o número de inscrição do Gene Bank das amostras sequenciadas neste trabalho estão na figura 2.

Com relação às porinas de isolados KPC negativo, há dois padrões identificados – das amostras 1509 e a 1299. A amostra 1509 pertence à paciente FLR, que possui outros dois isolados também avaliados, ambos KPC positivos. Esse isolado pertence ao clone predominando e tem padrão de mutações das ompF e ompC idênticos aos das dos outros isolados do clone prevalente. A amostra 1299 é do Clone E e tem o padrão de mutações das ompF e ompC diferente de todas as outras amostras. A ompF da amostra 1299 tem uma única mutação, a K47D.

Figura 2: Análise molecular (PCR, PFGE e sequenciamento completo do genoma) e CIM de ertapenem, amicacina, meroperem e tigeciclina de 42 amostras de *SmRc* do ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP, do período de 2010 a 2013 e dados epidemiológicos



	SCG							SCG/PCR*					MIC						SCG			
PFGE cluster (80%)	Date	Aminoglicosídeos	Fluoroquinolona	blaSRT-2	blaCTX-M	blaTEM-1A	blaOXA-101 or blaOXA-9	blaSHV-5	bla-NDM	blaKPC	Paciente	Clínica	Tipo de amostra	ERT	MER	AMK	Cepa	Diagnóstico	ompF	ompC	Plasmids	Número de acesso Genbank
A	nov-12								n	p	CFA	E_Cirúrgica	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	16 (S)	1520	Colonização				
A	jul-13								n	p	RG	E_MI	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	2 (S)	1772	Colonização				
A	dez-12	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	Drain	UTI_PSM	Ambiente	>=32 (R)	32 (R)	64 (R)	2039	Ambiente	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQD00000000
B	mai-13	p^3	p	p	n	p	p	n	n	p	MJB	E_Cirúrgica	Sangue	>=32 (R)	16 (R)	2 (S)	1707	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncL/M(pMU407)	QJQD00000000
B	abr-13	p^6	p	p	n	p	p	p	n	p	ILA	UTI_Cirúrgica	Cateter central	8 (R)	8 (R)	2 (S)	1673	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncL/M(pMU407)	QJQF00000000
C	nov-10	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	ABO	UTI_PSM	Cateter central	64 (R)	64 (R)	128 (R)	1056	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQG00000000
C	dez-10	p^2	n	p	p	p	p	n	n	p	TJS	UTI_Cirúrgica	Cateter central	1 (I)	0,25 (S)	128 (R)	1058	Infecção	Padrão 2	Padrão 2	IncQ1, Col440II, IncL/M(pMU407)	QJPU00000000
C	set-11	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	DOS	UTI_PSM	LBA	16 (R)	4 (R)	128 (R)	1052	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN, ColRNAI	QJPT00000000
C	jul-13	p^2	n	p	n	n	p	n	n	p	MFR*	E_Cirúrgica	Ascite	1 (I)	0,25 (S)	16 (S)	1763	Infecção	Padrão 2	Padrão 2	-	QJPW00000000
D	out-10	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	TCM (1)	E_TMO	Sangue	64 (R)	32 (R)	64 (R)	642	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJPS00000000
D	out-12	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	Tap	UTI_PSM	Ambiente	>=32 (R)	32 (R)	32 (I)	2032	Ambiente	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN, Col(IMGS31)	QJQJ00000000
D	ago-13								n	p	AFS	E_MI	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	4 (S)	1810	Colonização				
D	mai-13								n	p	JMC	UTI_PSC	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	8 (S)	1717	Colonização				
D	ago-12	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	MJC	E_PS	Sangue	64 (R)	32 (R)	64 (R)	1309	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN, ColRNAI	QJPV00000000
D	nov-12								n	n	FLR (1)	UTI_PSM	Swab vigilância	4 (S)	0,25 (S)	32 (I)	1511	Colonização				
D	out-12								n	p	PCM	UTI_Cirúrgica	Cateter central	8 (R)	2 (I)	8 (S)	1432	Infecção				
D	mai-13	p^4	p	p	n	n	n	n	n	p	JCS	UTI_PSC	Cateter central	8 (R)	8 (R)	64 (R)	1703	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQH00000000
D	jun-13	p^4	p	p	n	n	n	p	p	p	LCA	UTI_PSC	Sangue	16 (R)	4 (R)	16 (S)	1756	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncN	QJQH00000000
D	nov-12	p^4	p	p	n	n	n	p	n	p	FLR (2)	UTI_PSM	Sangue	8 (R)	4 (R)	16 (S)	1510	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncN	QMDQ00000000
D	jul-13								n	p	CCC	E_Cirúrgica	Cateter central	16 (R)	4 (R)	32 (I)	1762	Infecção				
D	out-13								n	p	FFQ	UTI_PSC	Swab vigilância	>=32 (R)	16 (R)	32 (I)	1845	Colonização				
D	out-13								n	n	APM	E_PS	Swab vigilância	>=32 (R)	16 (R)	32 (I)	1855	Colonização				
D	jul-12								n	p	CAF	UTI_PSC	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	16 (S)	1258	Colonização				
D	ago-12	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	LBC	E_TMO	Sangue	>=32 (R)	32 (R)	64 (R)	1283	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQB00000000
D	ago-12								n	p	CAL	UTI_PSM	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	64 (R)	1297	Colonização				
D	ago-11	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	MZ	UTI_PSM	Urina	64 (R)	32 (R)	128 (R)	1053	Colonização	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJPX00000000
D	ago-13								n	p	EFS	E_MI	Urina	>=32 (R)	16 (R)	32 (I)	1800	Infecção				
D	out-13	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	VPF	UTI_PSC	Swab vigilância	>=32 (R)	32 (R)	64 (R)	1844	Colonização	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQM00000000
D	jun-12								n	p	LAM	E_TMO	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	32 (I)	1231	Colonização				
D	set-12								n	p	DSS	UTI PSM	Sangue	16 (R)	2 (I)	32 (I)	1308	Infecção				
D	out-12								n	n	RNR	E TMO	Swab vigilância	0,5 (S)	1 (S)	16 (S)	1402	Colonização				
D	out-13								n	p	JL	E TMO	Swab vigilância	>=32 (R)	>=32 (R)	16 (S)	1856	Colonização				
D	out-12	p^5	p	p	n	n	n	n	n	p	Drain	UTI PSM	Ambiente	>=32 (R)	32 (R)	64 (R)	2031	Ambiente	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQI00000000
D	set-11	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	TCM (2)	E TMO	Sangue	>=32 (R)	16 (R)	64 (R)	1057	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJPY00000000
D	jul-12	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	AJM	UTI PSM	Urina	>=32 (R)	32 (R)	64 (R)	1257	Colonização	Padrão 1	Padrão 1	IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJPZ00000000
D	out-10	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	DT	E TR	Sangue	128 (R)	64 (R)	16 (S)	630	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJPR00000000
D	dez-12	p^4	p	p	n	n	n	n	n	n	FLR (3)	UTI PSM	Cateter central	2 (R)	0,5 (S)	64 (R)	1509	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQA00000000
D	jan-13								n	p	SDO	UTI_PSM	Swab vigilância	>=32 (R)	32 (R)	32 (I)	1621	Colonização				
D	abr-10	p^1	p	p	n	n	n	n	n	p	LCG	UTI PSM	Urina	64 (R)	32 (R)	64 (R)	1054	Infecção	Padrão 1	Padrão 1	IncQ1, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII, IncN	QJQL00000000
E	ago-12								n	n	EAS (1)	UTI Cirúrgica	Swab vigilância	32 (R)	8 (R)	64 (R)	1298	Colonização				
E	fev-12								n	n	ERHS	E_TR	Urina	>=32 (R)	16 (R)	64 (R)	2094	Infecção				
F	ago-12	p^3	n	p	p	p	n	n	n	n	EAS (2)	UTI_Cirúrgica	Sangue cateter	32 (R)	8 (R)	64 (R)	1299	Infecção	Padrão 3	Padrão3	-	QJQC00000000

[a] PFGE: *Pulsed field gel eletroforesis* e SCG: sequenciamento completo de genoma

[b] Dendrograma. Barras vermelhas representam isolados coletados nas unidades ligadas ao surto: UPSM e ETMO

*SCG/PCR- Sequenciamento complete do genoma/ protein chain reaction (*in house* e real time)

MIC- minimum inhibitory concentration

p = present, n = not detected.

[1]-aph(3')-VIa, aacA4, aac(6')-Ic, ant(2")-Ia,

[2]-aph(3')-VIa, aadA6, aac(6')-Ic, ant(2")-Ia,

[3]- aac(6')-Ic, aadA1, aac(6')-Iq,

[4]- aacA4, aac(6')-Ic, ant(2")-Ia,

[5]- aph(3')-VIa, aacA4, aac(6')-Ic,

[6]- aac(6')-Ib-cr,

[7]- aac(6')-Ib, aac(6')-Ic, aadA.

E_TMO- enfermaria de transplante de medula óssea, UTI_PSM – UTI de emergências da clínica médica, E_cirúrgica – enfermarias cirúrgicas, E_MI – enfermaria de moléstias infecciosas, E_TR – enfermaria de transplante renal, UTI_PSC – UTI de emergências cirúrgicas, E_PS- enfermaria do pronto socorro.

Drain- ralo da UTI_PSM, Tap – torneira da UPSM, LBA – lavado broncoalveolar, Swab- cultura de vigilância, ERT- ertapenem, MER- meropenem, AMK- amicacina.

Padrão – padrão de mutação das porinas.

Padrões de mutação da ompC:

Padrão 1: N48D, V50A, M135S, D157G, N1777S, G178A, A225G, N226G, H228Y, V252T, D271T, S273D, V274A, Y275F, Q322E, V351L, D358Q;

Padrão 2: V15L, N226G, G227A, H228Y, Q229R;

Padrão 3: N226G, G227A, H228Y, Q229R.

Padrões de mutação da ompF:

Padrão 1: G50D, Q55K, A87S, V185I, N215S, L222D, R223L, N225T, E226A, R227K, D229K, F260Y, G262E, G263S, N264D, T266S, N267_G277del, F278I, S280D, N310D, N312T, V313A, P314H, V316A, S318G, Q320A, D351K, D353E, K356E, T358N, G359K, D364N, L311_N312_insAGR, V316_G317_insRFD;

Padrão 2: K47D, D48N, N51D, S84A, L172V, Q179E, G182S, D184A, V185L, I195L, N215D, K221Q, L222Y, N225T, E226A, R227E, F260Y, G262E, G263A, N264D,

F265N, N267_G277del, F278I, S280N, V313A, P314T, G315F, V316T, S318G, Q320A, D353E, T358N, I360V, I365T, G367A, L311_N312_insRGRSAN;

Padrão 3: K47D

Tabela 13. Resultados da análise de concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo pelo método convencional e pelo método comercial, *Sensititre* (dos isolados de *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos no ICHC: 39 amostras clínicas de *Serratia mascecens* e 3 amostras ambientais (2010-2013)

Isolado	Método	ETP	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
630	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	2	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	2	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
630	Conv	128	16												64								
642	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
642	Conv	64	64												32								
1052	Sens		≥32	≥16	≥16	8	≥8	2	≥2	≥4/76	≥8	≥16	2	≥16	2	≥4	≥4	16	≥32	≥64/32	2	≥64/4	≥128/2
1052	Conv	16	128												4								
1053	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	2	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	32/4	≥128/2
1053	Conv	64	128												32								
1054	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
1054	Conv	64	64												32								
1056	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
1056	Conv	64	128												64								
1057	Conv	>=32	64												16								
1058	Sens		≥32	≥16	≥16	8	≥8	2	≥2	≥4/76	≥8	≥16	-	≥16	-	≥4	≥4	≥16	≥32	≥64/32	-	≥64/4	≥128/2
1058	Conv	1	128												0,25								
1231	Conv	>=32	32												>=32								

Isolado	Método	ETP	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
1257	Conv	>=32	64												32								
1258	Conv	>=32	16												>=32								
1283	Conv	>=32	64												32								
1297	Conv	>=32	64												>=32								
1298	Conv	32	64												8								
1299	Conv	32	64												8								
1308	Conv	16	32												2								
1309	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	≥4/76	≥8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
1309	Conv	64	64												32								
1402	Conv	0,5	16												1								
1432	Conv	8	8												2								
1509	Sens		≥32	≥16	≥16	≥16	≥8	8	≥2	≥4/76	≥8	-	-	contamin	**contamin**	≥4	≥4	2	4	32/16	-	contamin	32/2
1509	Conv	2	64												0,5								
1510	Sens		≥32	≥16	Sem crescimento	≥16	≥8	4	≥2	1/19	≥8	-	-	-	-	≥4	≥4	-	4	≥64/32	-	-	32/2
1510	Conv	8	16												4								
1511	Conv	4	32												0,25								
1520	Conv	>=32													>=32								
1621	Conv	>=32	32												32								
1673	Conv	8	2												8								
1703	Sens		≥32	≥16	Sem crescimento	≥16	≥8	8	≥2	2/38	≥8	≥16	≥8	8	2	≥4	≥4	4	8	≥64/32	2	32/4	≥128/2

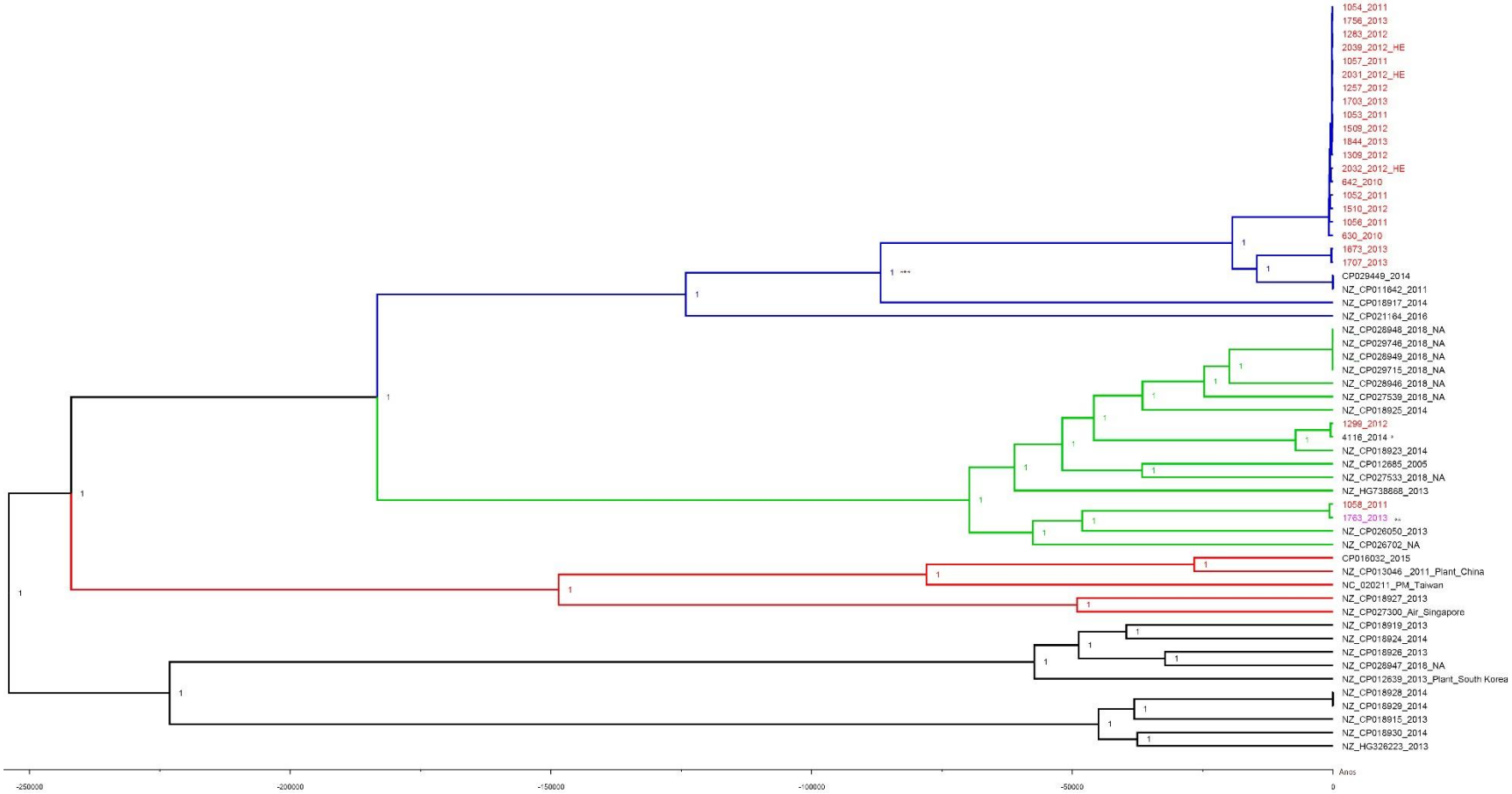
Isolado	Método	ETP	AMI	DOX	GEN	MIN	TOB	TGC	CIP	SXT	LEVO	AZT	IMI	FEP	MERO	COL	POL	TAZ	FOT	A/S2	DOR	P/T	TIM
1703	Conv	8	64												8								
1707	Conv	>=32	2												16								
1717	Conv	>=32	8												>=32								
1756	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	2/38	4	≥16	≥8	4	-	≥4	≥4	≥16	16	≥64/32	1	≥64/4	≥128/2
1756	Conv	16	16												4								
1762	Sens		≥32	≥16	8	≥16	≥8	4	≥2	-	8	≥16	≥8	≥16	≥8	≥4	≥4	8	16	≥64/32	≥4	≥64/4	≥128/2
1762	Conv	16	32												4								
1763	Sens		16	≥16	≥16	≥16	≥8	4	≥2	≥4/76	8	≥16	4	8	-	≥4	≥4	8	≥32	≥64/32	-	≥64/4	≥128/2
1763	Conv	1	16												0,25								
1772	Conv	>=32													>=32								
1800	Conv	>=32	32												16								
1810	Conv	>=32	4												>=32								
1844	Conv	>=32	64												32								
1845	Conv	>=32	32												16								
1855	Conv	>=32	32												16								
1856	Conv	>=32	16												>=32								
2031	Conv	>=32	64												32								
2032	Conv	>=32	32												32								
2039	Conv	>=32	64												32								
2094	Conv	>=32	64												16								
E. coli	Sens		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa	Sens		8	16	2	8	-	8	0,25	≥4/76	-	4	4	-	-	≥4	≥4	2	16	≥64/32	-	-	32/2

Sens – Sensititre

Conv - Convencional

ETP- Ertapenem, AMI- Amicacina, DOX- Doxiciclina, GEN- Gentamicina, MIN- Minociclina, , TOB- Tobramicina, TGC- Tigeciclina, CIP- Ciprofloxacina, SXT- Trimethoprim / Sulfamethoxazole, LEVO- levofloxacina, AZT- Aztreonam, IMI- Impenem, FEP- Cefepime, MERO- Meropenem, COL- colistina, POL- polimixina, TAZ- Ceftazidima, FOT- Cefotaxima, A/S2- Ampicillin / Sulbactam 2:1, DOR- Doripenem, P/T- Piperacilina / Tazobactam, TIM- - Ticarcilina/ ácido clavulâmico,

Figura 4: Arvore de SNP de 22 amostras de *SmRc* do ICHC Hospital das Clínicas da FMUSP, do período de 2010 a 2013 e dados epidemiológicos, e amostras de *S. marcescens* do GenBank



* Amostra do berçário do ICHC, não incluída no estudo

** Paciente sem critério de infecção hospitalar

*** Probabilidade de acerto da localização do nó

Números em vermelho são isolados pertencentes ao estudo: número do isolado_ano do isolamento

Números em preto são isolados incluídos a partir do Genbank, para construção da árvore

Discussão

Nosso estudo propõe-se a colaborar com o conhecimento sobre *S. marcescens*, ainda com poucas publicações e muito baseado em inferências do que conhecemos sobre as outras Enterobacteriaceae. Historicamente, observamos uma periódica alternância entre os gêneros mais prevalentes e, no panorama de aumento da resistência a carbapenêmicos e do consumo de polimixina, as Enterobacteriaceae intrinsecamente resistentes a polimixina têm estado entre as ameaças que poderão surgir. Dentre os estudos publicados até o momento, nossa casuística é a maior com *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos e inclui o momento do surgimento e disseminação desse novo perfil de resistência no Hospital das Clínicas de São Paulo. Com esses dados, pudemos avaliar fatores de risco para infecção por *SmRc*, clonalidade e fatores genéticos para resistência a carbapenêmicos. Conforme esperado, observamos que as infecções por *SmRc* estiveram associadas ao consumo prévio de polimixina, único fator de risco pela análise multivariada. Alguns autores têm questionado se o aumento no consumo de polimixina poderá mudar a incidência de bactérias intrinsecamente resistentes a esta droga. Em um estudo retrospectivo que incluiu 1,304 pacientes, Samonis e colaboradores (2014) observaram que a prevalência de infecções por EIRP aumentava de 5.8% para 7.4% ($p<0.001$) quando havia um aumento concomitante no uso de polimixina nas UTIs avaliadas ($p=0,013$) (SAMONIS et al., 2014). Infelizmente, não pudemos realizar essa análise pois não temos os dados sobre o consumo de antimicrobianos em nossas UTIs. No entanto, temos a informação de que na enfermaria de TMO, unidade onde surgiram os primeiros casos, houve um aumento de 4 vezes o número de isolados de bactérias multirresistentes/paciente dia de 2009 para 2010 (banco de dados de cepas MDR da SCCIH_ICHC). Esse aumento foi consequência de um surto de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, que provocou infecções com taxa de mortalidade superior a 80% (ref.). O mesmo aumento ocorreu também no restante do hospital: a elevação da taxa de infecções causadas por Enterobacteriaceae resistentes à carbapenêmicos foi de 12% para 18% nos mesmos anos. Em uma situação como essa, supomos que a indicação de polimixina deve ter aumentado, tanto para terapia empírica como para dirigida. O surgimento da *SmCr* coincidiu, portanto, com o período em que acreditamos ter havido aumento de consumo de polimixina, o que pode ter colaborado para sua permanência como novo patógeno e disseminação pelo hospital. Nenhum dos outros fatores de risco habitualmente citados em literatura, como diabetes e tumores sólidos, teve significância em análise multivariada. Parte da explicação para isso pode ser o tamanho da amostra,

pequeno para esse tipo de análise. A análise bivariada apontou também transplante de medula e uso prévio de cateter, dois fatores de risco previamente aprontados para infecção por Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos (MARIAPPAN; SEKAR; KAMALANATHAN, 2017). Insuficiência renal aguda foi a única comorbidade previamente descrita como fator de risco para infecção que apresentou tendência a significância nas duas análises. As patologias de base mais frequentes da nossa coorte foram tumores hematológicos, transplante de medula óssea e cirurgias de urgência, nenhuma delas descrita anteriormente como fator de risco para infecção por *Serratia marcescens*. As patologias cirúrgicas se destacaram, mas não tiveram significância estatística para risco de infecção. A falta do detalhamento das rotinas de busca ativa de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos em todas as unidades do hospital e pacote de medidas de controle adotadas dificulta a análise dos dados sobre a distribuição da incidência dos isolados no período estudado. Ainda assim, de um total de 11 UTIs, apenas duas se destacaram num período de 3 anos – sabemos que outras UTIs como a cirúrgica e de transplante de fígado também tiveram longos períodos de coleta de vigilância semanal. Como complementação do nosso estudo é necessário avaliar melhor o risco de MDR associado ao pronto socorro ou às duas UTIs de referência. O grupo de neoplasias e doenças hematológicas é o segundo maior em nossa casuística (18). A imunossupressão é fator de risco comum para infecção por bactérias MDR e *Serratia*, apesar disso, infecção por *Serratia* em paciente TCTH é infrequente e foi poucas vezes relatada (ref.). No entanto, esse grupo representa 17% da nossa casuística, uma frequência não relatada em outros surtos na literatura; os três primeiros pacientes identificados eram pacientes submetidos a TCTH. O TCTH teve significância para infecção apenas na análise bivariada, mas apesar da busca ativa por Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos na unidade, 63% dos pacientes têm diagnóstico de infecção. Apenas um foi identificado como colonizado antes do diagnóstico de infecção – paciente FLR. Outras condições clínicas frequentes nesse grupo também são fatores de risco para infecção por bactérias MDR, como uso de cateter venoso, quebra de barreira mucosa - 20–30% das bacteremias em pacientes submetidos a TCTH alogênico e 5% para os autólogos são por bactérias MDR (ALP; AKOVA, 2017). A coexistência de tantos fatores de confusão dificulta a análise que, para maior precisão, precisaria ser feita com uma casuística maior.

O principal mecanismo de resistência encontrado foi a presença do gene codificador da carbapenemase bla_{KPC-2}, presente em 71% das nossas amostras. Nas publicações brasileiras, a KPC também é a carbapenemase mais frequente em *Serratia*, seguido por IMP, mas nenhum dos nossos isolados identificou gene codificador de IMP (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; PINTO et al., 2014; MARGARETE et al., 2015; CAYÔ et al., 2017). O único outro gene decodificador de carbapenemase encontrado foi bla_{NDM-1}, caso já publicado por Perdigão e colaboradores (PERDIGÃO NETO et al., 2019). Outro mecanismo relacionado à resistência a carbapenêmicos detectado foi a presença de outras betalactamases do grupo das Classes A, C e D de Amber, que não conferem resistência isoladamente a carbapenêmicos, mas podem contribuir quando em associação com outros mecanismos. A expressão fenotípica dos genes codificadores de ESBL encontrados, como o bla_{CTX-M} e o $bla_{TEM1A,}$ e de AmpC, $bla_{SRT-2,}$ é multifatorial e envolve estímulo do ambiente, presença de genes supressores, mutação em porinas de membrana, número de cópias dos genes que codificam a carbapenemase e associação de mecanismos de resistência (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007). Para avaliarmos essa interação de fatores de resistência em nossas amostras, seria necessário um estudo de expressão gênica, que não fez parte do escopo no nosso trabalho, mas a partir de dados do genótipo, pudemos elaborar algumas hipóteses envolvendo porinas de membrana externa e plasmídeos. O efeito de mutações e deleções em porinas de membrana vem sendo mais estudado em outras espécies de Enterobacteriaceae, em especial a *E. coli*. Foi demonstrado por Cetri e colaboradores (CHETRI et al., 2019) que a exposição de *E. coli* ao imipenem parece estar vinculada à redução da expressão do gene *ompC* e redução de sensibilidade ao antimicrobiano. Ygit e colaboradores (YIGIT et al., 2002) identificaram o mesmo fenômeno em *Enterobacter aerogenes*. No caso da *Serratia*, dois grupos já demonstraram que a deleção ou redução da expressão da ompF correlaciona-se à resistência aos carbapenêmicos, mas a da ompC não (SUH et al., 2010; MOYA-TORRES et al., 2014). Pela avaliação do genoma completo das nossas amostras, não identificamos deleções de genes de porinas ompF ou ompC, mas não temos informações sobre a expressão desses genes ou número de cópias (MASI; PAGÈS, 2013). Para complementação do nosso trabalho, seria interessante um estudo de expressão gênica através de exposição dos isolados a gradiente de imipenem, reproduzindo estudos semelhantes da literatura. Avaliamos também as mutações encontradas em nossas amostras e verificamos que há 3 padrões, um deles com 87% de prevalência (20/23).

Nenhuma dessas mutações já foi estudada em Enterobacteriaceae e, por isso, não é possível concluir se estão relacionadas à resistência a carbapenêmicos. No entanto, nossos resultados indicam que a mutação K47D pode ter alguma relação e é uma boa hipótese para um próximo estudo, pois é a única mutação da ompF do isolado 1299 que tem genes codificadores de ESBL e AmpC mas nenhuma carbapenemase identificada. Essa mutação não está presente nos padrões 2 e 3 de porinas, os menos frequentes, mas não no padrão 1. Na avaliação dos plasmídeos, eles foram encontrados em 21 amostras. O mais frequente foi o de amplo espectro IncA/C2 e IncN (18/21). Também foram frequentes os plasmídeos de espectro estreito IncFIB(K) and IncFII (16/21). No isolado contendo bla_{NDM} identificamos IncA/C2, que é uma localização comum dessa enzima, e IncN, um plasmídeo descrito na origem da disseminação de bla_{NDM-1} entre Enterobacteriaceae não clonais. Os plasmídeos do tipo IncN tem sido descritos em muitos gêneros de bactérias, incluindo Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e em espécies menos frequentes como a *Photobacterium damselae*, um coco gram. negativo causador de doença em peixes (CARATTOLI, 2013). Esse achado reforça a hipótese já esperada de que o bla_{NDM} do nosso isolado tenha disso adquirido através de transmissão interespécies. Também encontramos os plasmídeos mais comumente associados ao gene $bla_{KPC-2,}$ como o IncFII, IncL/M, IncN ou IncA/C, mas não o IncX3, descrito em *S. marcescens* como portador de KPC-3(ADAMCZUK et al., 2015; LI et al., 2018). Em nossos dados, os plasmídeos mais frequentes são inéditos em *Serratia*, exceto IncL/M. Eles são de amplo espectro e já têm associação descrita às carbapenemase encontradas, o que nos ajuda a entender a concomitância do surgimento da *SmRc* com o aumento de *ERC* em nosso hospital; novamente, possivelmente transmissão interespécie.

A análise microbiológica dos isolados não confirmou a resistência a carbapenêmicos de duas amostras. A variação da expressão gênica pode ser a explicação para esse resultado e por isso optamos por manter os pacientes na análise de fatores de risco. Um desses isolados pertence à paciente FLR, que possui uma história interessante no sentido de nos ajudar nessa construção de hipóteses e por isso ela foi descrita com detalhes. Pela sequência dos fatos, nos parece que a paciente pode ter tido infecção por *S. marcescens* de duas cepas diferentes, não idênticas mas ambas pertencentes ao Clone D, com diferentes perfis de sensibilidade a carbapenêmicos. A coexistência de duas populações de bactérias com perfis de sensibilidade diferentes, heterorresistência ou resistência “internicho”, já foi descrita para outras bactérias (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015)

mas não para *Serratia*. Apesar disso, sabemos que a *Serratia* tem potencial genético para criar colônias com subpopulações clonais. Conforme Casorali e colaboradores, a *S. marcescens* é uma espécie heterogênea que provavelmente contém um número ilimitado de clones que podem se alternar como resposta às condições do ambiente (CASOLARI et al., 2005). Um estudo complementar populacional dessas amostras, com exposição a gradiente de concentração de imipenem, poderia confirmar ou descartar essa hipótese. Dentro do escopo do nosso trabalho, o que podemos afirmar é que pode haver heterorresistência em *Serratia*, o que traz as mesmas implicações clínicas que para as outras bactérias onde ela já foi descrita que é a falsa sensibilidade aos carbapenêmicos reportada pelo laboratório de análise clínica.

A avaliação molecular pelo PFGE identificou 1 clone prevalente, clone D, ao qual pertencem 30/42 amostras analisadas, incluindo 2/3 ambientais. A árvore de SNP também mostrou grande semelhança genética entre a maior parte das amostras: 20/23 pertencem ao mesmo clado. Ambos sugerem que o principal mecanismo da disseminação da *SmRc* foi transmissão cruzada entre pacientes. Os isolados pertencentes ao surto são, na maioria, do clone prevalente, incluindo as amostras ambientais, mas há

também isolados dos clones C e A. Pela comparação da arvore de SNP, todas as amostras pertencentes ao surto foram consideradas como originadas de ancestral comum. A classificação da relação entre os isolados tem variações entre os dois métodos, uma diferença esperada e ainda em discussão na literatura (BESSER et al., 2018; BOGATY et al., 2018; TOLAR et al., 2019). Pelos resultados do PFGE, diríamos que se trata de um surto poli clonal; outras publicações já mostraram surtos poli clonais de *Serratia* (DAMJANOVIC et al., 2005). No entanto, especula-se que o PFGE pode falhar na identificação de padrões relacionados (BOGATY et al., 2018). A árvore de SNP classificou apenas 2 casos em clados diferentes da principal: a 1299, a 1058. O isolado 1058 e a amostra 1763, não incluída como caso, pertencem ao mesmo clado. Elas também pertencem ao mesmo clone, clone C, são KPC-2 e OXA-101 positivos, compartilham um padrão de porinas único das duas amostras, o perfil 3 e são ambas amostras de pacientes cirúrgicos- tem mais semelhanças entre si do que o restante dos isolados do mesmo clone. A paciente MFR, do isolado 1763, não foi incluída por não preencher critérios de infecção hospitalar - a infecção intra-abdominal ocorreu 1 ano após a cirurgia realizada no ICHC – mas a análise molecular do isolado 1763 evidencia a relação entre os dois eventos e mostra que é provável que a paciente tenha permanecido colonizada por pelo menos 1

ano por esse agente. O isolado 1299 está em um terceiro clado, reunido com outra amostra também do ICHC, a 4116, não incluída no estudo por estar fora do período de inclusão. Esses resultados nos mostram que parece ter havido pelo menos 3 ancestrais diferentes para os isolados encontrados em nossa casuística. Nenhum deles compartilha ancestralidade com as amostras ambientais selecionadas do GenBank para construção da árvore, o que será discutido a seguir.

A análise molecular das amostras ambientais trouxe subsídio também para auxiliar na estimativa da importância do ambiente no surto de *SmRc* entre pacientes da UPSM e ETMO. Ao identificarmos um patógeno em um cultivo da microbiota ambiental, a primeira questão é se ele é o responsável pelas infecções e colonizações dos pacientes – a vantagem genética para sobrevivência no ambiente pode não ser a necessária para competir na microbiota dos pacientes. Mostramos pelos dois métodos moleculares que havia correlação genética entre as amostras ambientais e os isolados clínicos. Imaginando que talvez amostras de ambiente possam ter características semelhantes entre si, incluímos genomas ambientais do GenBank para comparação que na distribuição de clados foram classificadas como não relacionadas às nossas. Também é esperado que populações de bactérias que habitam em reservatórios ambientais apresentem, em geral, grande variedade genética (PIGHTLING et al., 2018), o que não aconteceu nas nossas amostras. Essas evidências indicam que, em nossa casuística, é mais provável que os clones dos pacientes tenham colonizado o ambiente e não o contrário. No entanto, não foi possível elucidar se o ambiente era causador ou perpetuador do surto ou mero achado, um colonizador transitório, uma pergunta controversa e difícil de ser respondida. No caso da *Serratia*, em se tratando de uma bactéria ubíqua e de elevada plasticidade genética, esse debate ganha especial importância. Conforme mencionado, há múltiplos relatos de surtos de *Serratia* cuja causa apontada foi contaminação de materiais e ambiente (MADANI et al., 2011; MAHLEN, 2011; GASTMEIER, 2014). Algumas publicações relatam contaminação persistente do ambiente que, acredita-se, colaborem para a dificuldade no controle de surtos de *Serratia* que permanecem por períodos prolongados, as vezes superiores a 1 ano (MAHLEN, 2011). Nenhum desses estudos utilizou sequenciamento completo do genoma para avaliação dos surtos. Ainda assim, a decisão sobre a coleta de culturas do ambiente não é inequívoca: a técnica de coleta, os locais da amostragem e o momento, são todos pontos críticos na tomada de decisão. Regev e colaboradores (REGEV-YOCHAY et al., 2018) descrevem um surto de *S. marcescens* sensível a

carbapenêmicos em UTI no qual foi implantado um pacote de medidas que incluíam treinamentos comportamentais, precaução de contato e culturas de ambiente. Na investigação foram identificados encanamentos e esgotos contaminados que foram substituídos. A troca reduziu o número de pontos de contaminação, mas não eliminou completamente – dos 18 pontos de coleta, a positividade variou de 14, no início da investigação, para 3 no final. Apesar da falha na eliminação total da *Serratia* do ambiente, Regev e colaboradores descreveram que a contenção do surto foi obtida. Na opinião desses pesquisadores, a redução da carga de contaminação ambiental foi importante no controle do surto, mesmo considerando a constatação de que a eliminação completa do patógeno do ambiente não é possível. Em nosso trabalho também observamos a coincidência da troca dos encanamentos contaminados com a interrupção da incidência de novos casos. Não foram feitas novas coletas ambientais, mas sabemos que há grande chance de que a *SmRc* não tenha sido eliminada do ambiente, no entanto, é possível que a eliminação de canos com biofilmes colonizados, como eram os da UPSM, tenham causado a redução da carga bacteriana circulante na unidade e colaborado com a redução da incidência de novos casos. Portanto, acreditamos que nosso resultado reforça a ideia de que a contaminação ambiental pode interferir no controle de surto por *Serratia*.

Em nossa casuística, conforme mencionado, o grupo de TCTH destaca-se, ocorrência incomum na literatura. Em uma observação de prevalência de bactérias Gram-negativas em TCTH no continente Europeu, publicada em 2017, *E. coli, K. pneumoniae e P. aeruginosa* foram as mais prevalentes (AVERBUCH et al., 2017). Na casuística de 2001 a 2009 do serviço de TMO do Hospital das Clínicas, publicado em 2012, os principais agentes Gram-negativos relatados foram *P. aeruginosa, K. pneumoniae* e *Acinetobacter sp* e não há nenhum caso de *S. marcescens* (MENDES et al., 2012). A partir de 2010, foram diagnosticados 6 casos de infecção por *S. marcescens* e 5 colonizações no período de 3 anos. É importante ressaltar que nenhuma alteração na rotina de culturas de vigilância foi feita na unidade nesse período - o aumento da incidência de *SmRc* no ETMO não foi, portanto, alteração na rotina de investigação. Analisamos esse grupo em separado para tentar identificar que fatores podem ter colaborado essa frequência incomum. Avaliando os dados clínicos dos casos de TCTH, é possível identificar a predominância de fatores de risco clássicos para aquisição de bactérias MDR e também de óbito- 7/11 transplantes autólogos, 8/11 neutropênicos, 8/11 com mucosite - no entanto, estudos de fatores de risco de infecções por bactérias MDR não costumam incluir *Serratia* ou outras

Enterobacteriaceae intrinsecamente resistentes a polimixina. Dos resultados do nosso trabalho, a correlação de uso prévio de polimixina e infecção é o que melhor ajuda a explicar o aparecimento da *SmRc* nestes pacientes. Sobre os desfechos, observamos que a proporção entre pacientes infectados e colonizados foi maior entre os pacientes submetidos a TCTH do que no restante da população estudada, assim como a mortalidade, que foi de 64%. Entre os pacientes com transplante alogênico a mortalidade ainda maior, de 80% (6/7); 3 nos 30 dias após isolamento da *S. marcescens*. Essas taxas são bastante elevadas quando observamos a descrição de surto de Knowles e colaboradores (KNOWLES et al., 2000) que incluíram 8 casos, com isolados eram sensíveis a carbapenêmicos, e nenhum óbito. Também são mais elevadas do que no estudo de Kim e colaboradores (KIM et al., 2015) que descrevem uma taxa de mortalidade relacionada a infecção por *S. marcescens* em pacientes de UTI de 22,4% a 40% em 30 dias. Silva e colaboradores (SILVA et al., 2015) analisaram subpopulações e descreveram taxas de até 100% em subgrupos de pacientes susceptíveis. Taxas elevadas de óbito em pacientes infectados por bactérias MDR são habituais e a questão que se coloca é quanto da mortalidade desses pacientes pode ser atribuída à infecção ou ao quadro clínico, em geral mais grave - a quantificação de risco de óbito e outros desfechos relacionados a infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos é ainda hoje um desafio (CASSINI et al., 2019). Entre os nossos pacientes de TCTH, apenas 1 evoluiu a óbito durante o tratamento da infecção. Infelizmente, o desenho do nosso estudo não nos permite avaliar estatisticamente os desfechos e, por isso, não conseguimos responder se a infecção por *SmRc* teve impacto direto no prognostico, ou se foi coadjuvante ou um marcador de gravidade. Ainda assim, chama a atenção o surgimento desse patógeno entre pacientes com imunodeficiência grave, já que da mesma forma que conseguiu se estabelecer como um agente novo, pode mudar outras características de seu comportamento adquirindo maior virulência, por exemplo. São isolados para os quais, frequentemente, não há nenhuma opção terapêutica e, portando, uma ameaça constante para paciente com TCTH cuja fragilidade clínica e imunobiológica são por si fatores definidores de piores desfechos.

Em função do desenho do nosso estudo, não conseguimos fornecer dados inequívocos quanto a fatores de risco de aquisição de infecção de *Serratia* e a correlação dessas infecções com mortalidade. Mas nossa casuística é uma das maiores da literatura e poderá fornecer dados para novos estudos focados nesse patógeno. Também não pudemos avaliar

risco de óbito e desfechos clínicos. Outra fragilidade observada foi a falta de dados sobre DDD de antimicrobianos no ICHC, o que fortaleceria a construção de hipóteses e a discussão sobre o surgimento da *SmRc* no hospital e sua distribuição nas unidades. O registro das condutas relacionadas a controle de MDR em cada setor também teriam impactado essa mesma discussão. Num estudo prospectivo, também seria possível a uniformização de coletas de culturas de vigilância para viabilização da definição de caso e controle. Na análise microbiológica, o desafio foi a reprodutibilidade das técnicas que já estão muito bem padronizadas para estudo de espécies mais estudados, como a *K. pneumoniae* e a *E. coli*, mas não para a *S. marcescens.* A metodologia usada por programas de construção de genomas e análise deles baseia-se em cálculos estatísticos que levam em consideração dados conhecidos de cada espécie. O melhor exemplo da escassez de dados sobre a *Serratia* é a classificação de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) que ainda não foi feita para *Serratia*. A construção de árvore de SNP foi o nosso resultado com maior prejuízo. A técnica de construção escolhida oferece a possibilidade de identificar ancestrais comuns e também o tempo mais provável da separação entre dois clados. No entanto, nosso resultado mostra diferenças que variam entre 0 e 250000 anos, o que é pouco provável quando comparamos esse dado com o de artigos semelhantes. Moradigaravand e colaboradores (MORADIGARAVAND et al., 2016) fizeram um estudo populacional de *Serratia* do banco de cepas da Inglaterra, contento 205 isolados do período entre 2001 e 2011. Eles fizeram também uma árvore de máxima verossimilhança a partir da análise de 3372 genes do core e verificaram que a coleção era composta em grande parte por um número limitado de clones que haviam se diferenciado nas últimas décadas. A diferença entre o nosso resultado e o do grupo da Inglaterra pode ter sido causada pela quantidade de isolados ou pela quantidade de genes avaliados. A construção da linha do tempo baseia-se em cálculos de probabilidade feitos a partir da comparação de genes compartilhados entre os isolados e quanto maior esses números, maior a precisão do cálculo. Também tivemos dificuldade pela escassez de genótipos disponíveis para seleção na construção da árvore – não há nenhum genótipo ambiental brasileiro para inclusão em nossa análise, o que poderia ter aumentado a chance de semelhanças entre essas amostras e as nossas. Também não avaliamos nesse estudo a expressão dos genes encontrado, um projeto que poderá ser realizado numa próxima etapa, com possibilidade de acrescentar conhecimento importante ao descrito em nosso estudo até aqui. Mesmo sem esse dado, mostramos uma informação nova quanto ao

compartilhamento pela *Serratia* de plasmídeos importantes na disseminação de carbapenemase, ainda não descritos nesse gênero.

Unidades críticas com alta prevalência de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos têm adotado a polimixina como terapia empírica para sepse alegando direcionamento para a epidemiologia local, mas não temos dados objetivos que nos indiquem em quais situações isso está indicado. A partir de qual valor de prevalência de patógenos resistentes a carbapenêmicos devemos implantar o uso da polimixina como terapia empírica inicial?

Novas combinações de antimicrobianos, como ceftazidima-avibactam ou meropenem-vaborbactam, podem ser uma solução atual para o desafio no tratamento de *SmRc*, mas esses antimicrobianos têm pouca experiência clínica e custo elevado, limitando seu potencial de uso imediato. Em nosso estudo prévio, foram avaliados 5 isolados de *S. marcescens* portadora de blaKPC-2 e observado que ceftazidima-avibactam tinha atividade e ação sinérgica com meropenem contra esse patógeno (GAUDERETO et al., 2019). Nossos dados reforçam que as políticas de uso racional de antimicrobianos são de extrema importância e, neste momento, a principal ferramenta para manutenção de opções de tratamento de paciente no futuro próximo. Clínicos devem estar muito atentos, em especial nas populações de pacientes imunodeprimidos, onde as bactérias MDR têm maior risco. Além disso, políticas comportamentais direcionadas a higiene de mãos e limpeza de ambiente precisam reforço contínuo. Gastos desnecessários de recursos e de vidas humanas podem ser poupadas quando implementadas as medidas corretas de controle de infecções por bactérias multirresistentes.

Conclusões

Conclusões

- O uso prévio de polimixina B ou E foi o único fator de risco para infecção por *Serratia marcescens* resistente aos carbapenêmicos

- O principal mecanismo de resistência a carbapenêmicos em *Serratia* foi a presença do gene bla_{KPC-2}

- Outros genes que podem estar relacionados à resistência aos carbapenêmicos encontrados em menor frequência foram: bla_{CTX-M} e o bla_{TEM1A}, bla_{SRT-2} e bla_{NDM}.

- A mutação do gene ompF K47D pode estar associada a resistência aos carbapenêmicos em *Serratia*

- Plasmídeos de amplo espectro foram identificados e podem estar relacionados à aquisição de genes de resistência pela *Serratia*.

- A análise por PFGE identificou cinco clones, dentre os quais, há um predominante

- A análise por sequenciamento completo revelou que todos os isolados de amostras clínicas e ambientais apresentavam a mesma ancestralidade

Anexos

Ficha de investigação epidemiológica de pacientes com isolado de *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos no ICHC

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome:_____ REGISTRO: _____

Sexo: ☐ M ☐ F Data de nascimento: __/__/___

Data da internação hospitalar: __/__/__

Data de internação na unidade: __/__/__ Data saída: __/__/__

Passagens na internação:

Unidades:	Data de entrada	Data de saída
_____	___/__/__	__/__/__
_____	___/__/__	__/__/__
_____	___/__/__	__/__/__
_____	___/__/__	__/__/__

DATA coleta 1ª cultura: ____/____/_____	
Material:	
Infecção ( )	Diagnóstico:

II – HISTÓRIA MÉDICA:

Doença de base:_____

Comorbidades:

HAS ( ), DM( ), IRC( ), IRA( ), TU sólido( ), Trauma( ), Hepatopatia( ), TU hemato( ) TOS ( ) TMO ( ) neutropenia ( )

III- PROCEDIMENTOS DE RISCO 30 DIAS ANTES DA CULTURA POSITIVA:

	Data colocação	data retirada
1. Cateter vascular periférico	_____	_____
2. Cateter vascular central:	( )permicath, ( )intra-cath/shilley ( ) port-cath	
	_____	_____
3. Sonda vesical de demora:	_____	_____
4. Intubação oro-traqueal	_____	_____
5. Traqueostomia	_____	_____
6. Diálise	_____	_____

IV- USO DE ANTIMICROBIANOS 30 DIAS ANTES DA CULTURA:

1. Cefalosporinas de 3 e 4 geração: □Sim □Não Dias de uso:_____
2. Piperacilina/Tazobactam: □Sim □Não Dias de uso:_____
3. Imipenem: □Sim □Não Dias de uso:_____
4. Cipro: □Sim □Não Dias de uso:_____
5. Levo: □Sim □Não Dias de uso:_____
6. Amicacina: □Sim □Não Dias de uso:_____
7. Genta: □Sim □Não Dias de uso:_____
8. Polimixina: □Sim □Não Dias de uso:_____
9. Metronidazol: □Sim □Não Dias de uso:_____
10. Tigeciclina: □Sim □Não Dias de uso:_____

VI- INTERVENÇÕES DE RISCO 30 DIAS ANTES (sim/não)

- Quimioterapia ( )
- Corticóides ( )
- NPP ( )
- Radioterapia **( )**
- Cirurgias **( )**
- Internação UTI : data da entrada ___/___/__ data saída:___/___/____

VII- OUTRAS INFECÇÕES (BACTERIANAS, FÚNGICAS OU VIRAIS) 15 DIAS ANTES DO ISOLAMENTO SERRATIA

Diagnóstico 1:_____

Data de isolamento:__/___/___ Material orgânico:_____

Diagnóstico2: _____

Data de isolamento:__/___/___ Material orgânico:_____

VIII- Neutropenia (no momento da infecção nos casos e o menor valor nos controles):

- **Neutrófilos**

Numero absoluto: cell/mm^3

Tempo de neutropenia: _____ dias (precedendo 15 dias a infecção nos casos e durante a internação nos controles)

Infecção local do cateter

Sim □ não □

Infecção do sítio de inserção: □

Retirada cateter**:** □ sim □ não

Colonização prévia : □ sim □ não

Infecção polimicrobiana ( )

Agente: _____

Estado Clínico:

Sepse ( ) Sepse Grave ( ) Choque Séptico ( )

Apache: ___

Tratamento:

ATB usado: _____

POLIMIXINA ( ) TIGECICLINA ( ) AMG ( )

POLI + AMG + CARBAPENEM ( )

POLI + AMG + TIGE ( )

OUTRO: _____

Início do tratamento: __/__/__

Final do tratamento: __/__/__

Novo isolamento da *Serratia* ( ) Sítio do isolamento ( )

Desfecho

Alta ( ) Óbito ( )

Referências

Referências

ADAMCZUK, M. et al. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β-Lactam Resistance Genes among the Enterobacteriaceae. **BioMed research international**, v. 2015, p. 414681, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26236726>. Acesso em: 11 jun. 2019.

ALP, S.; AKOVA, M. Antibacterial Resistance in Patients with Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5224809/>. Acesso em: 26 set. 2019.

ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTFiOGRhOTYtYzZjOS00NmZmLWE5MWUtN2RkNDhiZGJiOGE1IiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVlZGQ4MSJ9>. Acesso em: 26 set. 2019.

AVERBUCH, D. et al. Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Rods Causing Bacteremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Intercontinental Prospective Study of the Infectious Diseases Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 11, p. 1819–1828, 13 nov. 2017. Disponível em: <http://academic.oup.com/cid/article/65/11/1819/4036247>. Acesso em: 2 out. 2019.

BAKKIYARAJ, D.; SIVASANKAR, C.; PANDIAN, S. K. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia* marcescens causing nosocomial infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3089–3094, 1 maio 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12003848?via%3Dihub>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BESSER, J. et al. **Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infectionsClinical Microbiology and Infection**Elsevier B.V., , 1 abr. 2018. .

BEUCHÉE, A. et al. Outbreak of *Serratia* marcescens in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, n. 1, p. 17–22, 2009.

BLASSMANN, U. et al. Cerebrospinal fluid penetration of meropenem in neurocritical care patients with proven or suspected ventriculitis: a prospective observational study. **Critical care (London, England)**, v. 20, n. 1, p. 343, 24 out. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776537>. Acesso em: 14 mar. 2019.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 28 out. 2019.

BOGATY, C. et al. Investigation of a Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 21 nov. 2018.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, 2014.

BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Klebsiella Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 2004.

BURKET, L. W.; BURN, C. G. Bacteremias Following Dental Extraction. Demonstration of Source of Bacteria by Means of a Non-Pathogen (*Serratia* Marcesens). **Journal of Dental Research**, v. 16, n. 6, p. 521–530, 9 dez. 1937. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00220345370160060501>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, mar. 2010.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995920>. Acesso em: 13 mar. 2019.

CAI, J. C. et al. Emergence of *Serratia* marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2014–8, jun. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332176>. Acesso em: 10 mar. 2019.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 1 ago. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422113000167?via%3Dihub>. Acesso em: 15 out. 2019.

CASOLARI, C. et al. A simultaneous outbreak of *Serratia* marcescens and Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 312–320, dez. 2005.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 1 jan. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30409683>. Acesso em: 6 out. 2019.

CAYÔ, R. et al. *Serratia* marcescens harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 357–358, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.008>.

CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections in the Acute Care Setting. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.socinorte.com/wp-content/uploads/2013/03/Criterios-de-IN-2013.pdf>. Acesso em: 7 maio. 2019.

CDC. **Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>. Acesso em: 10 mar. 2019.

CGE Server. Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>. Acesso em: 28 out. 2019.

CHALLAGUNDLA, L. et al. Phylogenomic classification and the evolution of Clonal complex 5 methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the Western Hemisphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, 22 ago. 2018.

CHEN, S. et al. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a teaching hospital in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2493–2494, 2011.

CHETRI, S. et al. Transcriptional response of OmpC and OmpF in Escherichia coli against differential gradient of carbapenem stress. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 138, 14 dez. 2019. Disponível em: <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4177-4>. Acesso em: 16 out. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **M100S Performance Standards for Antimicrobial**. [s.l: s.n.]

COLLIN, B. A. et al. Evolution, Incidence, and Susceptibility of Bacterial Bloodstream Isolates from 519 Bone Marrow Transplant Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 947–953, 1 out. 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/322604>. Acesso em: 11 mar. 2019.

COULTHURST, S. J. et al. Metabolic and regulatory engineering of *Serratia* marcescens: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. **Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 1899–1911, 1 jul. 2006. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28803-0>. Acesso em: 11 mar. 2019.

CVE. **Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares do Estado de São Paulo Análise dos Dados**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/aulas/ih18_apresentacao_dados2017.pdf>. Acesso em:

10 mar. 2019.

DABOS, L. et al. SME-4-producing *Serratia* marcescens from Argentina belonging to clade 2 of the S. marcescens phylogeny. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 16 abr. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkz115/5472241>. Acesso em: 28 abr. 2019.

DAMJANOVIC, V. et al. Outbreaks of Infection in Intensive Care Units—Usefulness of Molecular Techniques for Outbreak Analysis. **Infection Control in the Intensive Care Unit**, n. 1, p. 247–296, 2005.

DAVIES, T. A. et al. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1510–2, abr. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250190>. Acesso em: 14 mar. 2019.

DE OLIVEIRA, P. M. R. et al. Identification of carbapenemase genes in *Serratia* spp. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. P39, 1 out. 2014. Disponível em: <https://bmcproc.biomedcentral.com/articles/10.1186/1753-6561-8-S4-P39>. Acesso em: 26 set. 2019.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L. de; SANTOS, F. A. dos. Sepse por *Serratia* marcescens KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 365–367, out. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442010000500004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 11 mar. 2019.

DIENE, S. M.; ROLAIN, J. M. **Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter speciesClinical Microbiology and Infection**, 2014. . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1469-0691.12655>. Acesso em: 23 mar. 2019.

DOE, M. R. et al. A *Serratia* marcescens OxyR Homolog Mediates Surface Attachment and Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 20, p. 7262–7272, 2007.

DORTET, L. et al. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-

type extended-spectrum β-lactamase without significant carbapenemase activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3823–8, jul. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870062>. Acesso em: 24 mar. 2019.

DRLICA, K.; GENNARO, M. L. Plasmids. **Encyclopedia of Genetics**, p. 1485–1490, 1 jan. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800010004>. Acesso em: 16 out. 2019.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**, v. 4, n. 5, p. 699–710, maio 2006.

DURMAZ, R. et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 5, p. 372–377, 2009.

ECDC. **Healthcare-associated infections acquired in intensive care units Reporting on data retrieved from TESSy* on 22 May 2017 Key facts**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-acquired-intensive-care-units-annual>. Acesso em: 10 mar. 2019.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 191–207, jan. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567227>. Acesso em: 23 jun. 2019.

FERREIRA FIRMO, E. et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzymes genes among Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis and *Serratia* marcescens clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 7 set. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519302322>. Acesso em: 15 out. 2019.

GASTMEIER, P. *Serratia* marcescens: an outbreak experience. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 81, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639671>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GAUDERETO, J. J. et al. Synergistic Effect of Ceftazidime-Avibactam with Meropenem against Panresistant, Carbapenemase-Harboring Acinetobacter baumannii and *Serratia* marcescens Investigated Using Time-Kill and Disk Approximation Assays. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. e02367-18, 1 maio 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30783003>. Acesso em: 5 jul. 2019.

GRUBER, T. M. et al. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia* marcescens harbouring blaNDM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1026–1030, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/70/4/1026/799268>. Acesso em: 3 jun. 2019.

GUPTA, N. et al. Outbreak of *Serratia* marcescens bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1 jul. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729502>. Acesso em: 10 mar. 2019.

HADDY, R. I. et al. Nosocomial infection in the community hospital: severe infection due to *Serratia* species. **The Journal of family practice**, v. 42, n. 3, p. 273–7, mar. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636679>. Acesso em: 10 mar. 2019.

HO, S. Y. W.; SHAPIRO, B. **Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequencesMolecular Ecology Resources**, maio 2011. .

Home - Nucleotide - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>. Acesso em: 8 nov. 2019.

HORNG, Y.-T. et al. The RssAB Two-Component Signal Transduction System in *Serratia* marcescens Regulates Swarming Motility and Cell Envelope Architecture in Response to Exogenous Saturated Fatty Acids. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3407–3414, 2005.

HUBBARD, A. T. M. et al. Illumina short-read and MinION long-read WGS to characterize the molecular epidemiology of an NDM-1 *Serratia* marcescens outbreak in Romania. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, p. 672–679, 2017.

JAIN, A.; SRIVASTAVA, P. Broad host range plasmids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, n. 2, p. 87–96, 2013.

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 672–681, 1 nov. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867013002298?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2019.

KHANNA, A.; KHANNA, M.; AGGARWAL, A. *Serratia* marcescens- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 7, n. 2, p. 243–6, fev. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23543704>. Acesso em: 10 mar. 2019.

KIM, S. B. et al. Risk Factors for Mortality in Patients with *Serratia* marcescens Bacteremia. **Yonsei Med J**, v. 56, p. 348, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2015.56.2.348>. Acesso em: 10 mar. 2019.

KNOWLES, S. et al. An outbreak of multiply resistant *Serratia* marcescens: The importance of persistent carriage. **Bone Marrow Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 873–877, 3 abr. 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/1702218>. Acesso em: 11 mar. 2019.

KUHNERT, P. et al. Identi fi cation of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. v. 89, p. 1–7, 2012.

LAZZARO, M.; FELDMAN, M. F.; GARCÍA VÉSCOVI, E. A Transcriptional Regulatory Mechanism Finely Tunes the Firing of Type VI Secretion System in Response to Bacterial Enemies. **mBio**, v. 8, n. 4, p. 1–17, 2017.

LI, B. et al. Dissemination of KPC-2-Encoding IncX6 Plasmids Among Multiple Enterobacteriaceae Species in a Single Chinese Hospital. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 478, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29616001>. Acesso em: 11 out. 2019.

LIN, C.-S. et al. RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia*

marcescens. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4870–81, 1 nov. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713626>. Acesso em: 12 mar. 2019.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28–S36, 15 fev. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/215/suppl_1/S28/3092084>. Acesso em: 24 mar. 2019.

LUZZARO, F. et al. Repeated epidemics caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia* marcescens strains. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 629–36, set. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832264>. Acesso em: 10 mar. 2019.

MADANI, T. A. et al. *Serratia* marcescens-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 1, p. 16–19, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.12.017>.

MAHLEN, S. D. *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–791, 1 out. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976608>. Acesso em: 10 mar. 2019.

MARGARETE, E. et al. KPC-PRODUCING *Serratia* marcescens IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 359–360, ago. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000400359&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 31 maio. 2019.

MARIAPPAN, S.; SEKAR, U.; KAMALANATHAN, A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **International journal of applied & basic medical research**, v. 7, n. 1, p. 32–39, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251105>. Acesso em: 12 jun. 2019.

MASI, M.; PAGÈS, J.-M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane

Proteins Involved in Drug Transport in Enterobactericeae: the OmpF/C - TolC Case. **The open microbiology journal**, v. 7, p. 22–33, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569467>. Acesso em: 15 out. 2019.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2015.

MENDES, E. T. et al. Healthcare-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation patients: risk factors and impact on outcome. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. e424-8, 1 jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22463920>. Acesso em: 2 out. 2019.

MITCHELL, B. G. et al. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, n. 3, p. 211–217, 1 nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670115003126?via%3Dihub>. Acesso em: 6 jun. 2019.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906–909, 2012.

MORADIGARAVAND, D. et al. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia* marcescens clones within the United Kingdom and Ireland. **Genome Research**, v. 26, n. 8, p. 1101–1109, 2016. Disponível em: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.205245.116.>. Acesso em: 28 abr. 2019.

MOYA-TORRES, A. et al. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia* marcescens. **Microbiology**, v. 160, n. Pt_9, p. 1882–1892, 1 set. 2014. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.081166-0>. Acesso em: 11 jun. 2019.

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, 1 jul. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14618334>. Acesso em: 21

jun. 2019.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 28 out. 2019.

NEUNER, E. A.; GALLAGHER, J. C. Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in the treatment of critically Ill patients infected with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 440–452, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27589330>. Acesso em: 28 abr. 2019.

NODARI, C. S. et al. Draft genome sequence of a GES-5-producing *Serratia* marcescens isolated in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 191–192, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.002>. Acesso em: 31 maio. 2019.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141584>. Acesso em: 23 mar. 2019.

PARODY, R. et al. Severe Infections after Unrelated Donor Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Adults: Comparison of Cord Blood Transplantation with Peripheral Blood and Bone Marrow Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 7, p. 734–748, 1 jul. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879106002539?via%3Dihub>. Acesso em: 11 mar. 2019.

PERDIGÃO NETO, L. V. et al. Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: synergy with meropenem. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 1, p. 177–181, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/74/1/177/5146522>. Acesso em: 15 out. 2019.

PETERSEN, L. M.; TISA, L. S. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles . **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 627–640, 2013.

PETERSEN, L. M.; TISA, L. S. Molecular characterization of protease activity in *Serratia* sp. strain SCBI and its importance in cytotoxicity and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 22, p. 3923–3936, 2014.

PIGHTLING, A. W. et al. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, 10 jul. 2018.

PINTO, F. D. M. et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Clinical And Biomedical Research**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: Molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 501–512, 2007.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 5 dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000200174&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 15 out. 2019.

RAMBAUT, A. et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.

REALPHY Online Tool. Disponível em: <https://realphy.unibas.ch/realphy/>. Acesso em: 28 out. 2019.

REGEV-YOCHAY, G. et al. Sink traps as the source of transmission of OXA-48–producing *Serratia* marcescens in an intensive care unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 11, p. 1307–1315, 4 nov. 2018. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0899823X18002350/type/journal_article>. Acesso em: 24 mar. 2019.

RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 4, p. 414–426, 1 dez. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889309003629?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2019.

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. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.062141-0>. Acesso em: 26 set. 2019.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944–945, 1 out. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120685>. Acesso em: 21 jun. 2019.

SAMONIS, G. et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1505–1510, 15 set. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-014-2097-8>. Acesso em: 5 jun. 2019.

SEIFERT, H. et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4328–4335, 2005.

SILVA, A. A. da. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) produzido por enterobactérias: mecanismo de ação, diagnóstico e controle. 2015. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUBD-A3PHS2>. Acesso em: 13 mar. 2019.

SILVA, K. E. et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia* marcescens isolates from an outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2015.

SUH, B. et al. Outbreak of meropenem-resistant *Serratia* marcescens comediated by chromosomal AmpC β-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5057–5061, 2010.

TOLAR, B. et al. **An Overview of PulseNet USA DatabasesFoodborne Pathogens**

and Disease Mary Ann Liebert Inc., , 1 jul. 2019. .

TreeAnnotator | BEAST Documentation. Disponível em: <https://beast.community/treeannotator>. Acesso em: 5 nov. 2019.

TSUMURA, R. et al. The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Meropenem in the Cerebrospinal Fluid of Neurosurgical Patients. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 615–621, 18 out. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028626>. Acesso em: 14 mar. 2019.

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 jun. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28431850>. Acesso em: 5 jun. 2019.

TURNER, P. J. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, n. 2, p. 217–222, 1 fev. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889308004744?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2019.

VFDB: Virulence Factors of Bacterial Pathogens. Disponível em: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>. Acesso em: 28 out. 2019.

WHO. **Combat Antimicrobial Resistance**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/world-health-day/2011>. Acesso em: 10 mar. 2019.

WHO. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. **WHO**, 2016.

WILLCOX, M. D. P. et al. Quorum-Sensing Regulation of Adhesion in *Serratia* marcescens MG1 Is Surface Dependent. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 7, p. 2702–2711, 2007.

YANG, Y. J.; WU, P. J.; LIVERMORE, D. M. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia* marcescens isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 755–8, maio 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2193618>. Acesso em: 10 mar.

2019.

YE, Y. et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 1, p. 1143–1149, jan. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29399114>. Acesso em: 12 mar. 2019.

YIGIT, H. et al. Carbapenem resistance in a clinical isolate of Enterobacter aerogenes is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3817–22, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435682>. Acesso em: 16 out. 2019.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640–4, 1 nov. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dks261>. Acesso em: 21 jun. 2019.