



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ingrid Macedo Felício

**Investigação fenotípica e molecular de carbapenemases em *Serratia* spp.**

Rio de Janeiro

2022

Ingrid Macedo Felício

**Investigação fenotípica e molecular de carbapenemases em *Serratia* spp.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F314 Felício, Ingrid Macedo.  
Investigação fenotípica e molecular de carbapenemases em *Serratia* spp. /  
Ingrid Macedo Felício – 2022.  
96f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques.  
Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade  
de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Infecções por Enterobacteriaceae - Teses. 2. Infecções por *Serratia*. 3.  
Enterobacteriáceas Resistentes a Carbapenêmicos. 4. Biomarcadores - Teses. I.  
Marques, Elizabeth de Andrade. II. Leão, Robson de Souza. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Ingrid Macedo Felício

**Investigação fenotípica e molecular de carbapenemases em *Serratia* spp.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 11 de agosto de 2022.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Edgard de Freitas Vianna

Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família que me apoiou de todas as formas para que eu conseguisse me dedicar aos estudos.

Aos meus amigos, pelo incentivo nos momentos difíceis, fundamentais para seguir em frente.

À minha orientadora Elizabeth Marques e ao meu coorientador Robson Leão, obrigada por todos os ensinamentos, todo o empenho e cuidado que oferecem aos seus alunos faz toda a diferença durante esse percurso, tenho os senhores como um exemplo a ser seguido.

Aos meus colegas de Laboratório, Jéssica, Edgard, Mila, Nicoli, Ludmila e Guilherme, obrigada por toda a ajuda, companheirismo e parceria.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, em especial as técnicas do Laboratório 2, Elisa e Márcia, obrigada por compartilharem seus conhecimentos e por darem todo o suporte necessário.

A todos os professores do Departamento, agradeço pelos ensinamentos que foram essenciais para a minha formação.

À UERJ pelo acolhimento, e por ter me proporcionado grandes conquistas pessoais e amizades que levarei para a vida.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento.

O que vale na vida não é o ponto de partida  
e sim a caminhada. Caminhando e semeando,  
no fim terás o que colher.

*Cora Coralina*

## RESUMO

FELÍCIO, Ingrid Macedo. **Investigação fenotípica e molecular de carbapenemases em *Serratia* spp.** 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

*Serratia* spp., comumente associado a infecções relacionadas à assistência em saúde, é capaz de carrear uma variedade de genes que conferem resistência aos antimicrobianos, representando um importante desafio em relação a escolha da terapêutica adequada. O objetivo desse estudo foi identificar as espécies de *Serratia* spp., a presença de genes associados a resistência aos carbapenêmicos e avaliar a relação de similaridade entre as amostras. Foram analisadas 103 amostras isoladas de pacientes assistidos em um hospital universitário, entre 2002 e 2020. A identificação fenotípica foi realizada por provas bioquímicas, por espectrometria de massa e pelo sistema automatizado VITEK® 2. Além disso, foram pesquisados biomarcadores espécie-específicos pela análise dos espectros de massa. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado por disco-difusão. A detecção de genes codificadores de enzimas com atividade de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>) foi realizada por PCR. A similaridade entre as amostras foi estudada a partir da observação dos agrupamentos representados graficamente em dendrograma e árvore filoproteômica. Todas as amostras foram identificadas como *Serratia marcescens* pelos testes bioquímicos. Os resultados obtidos pelo MALDI TOF mostraram que todas as amostras foram caracterizadas em gênero, 62 (60,1%) foram identificadas como *S. marcescens* e 12 (11,6%) como *Serratia ureilytica*. A análise de *S. ureilytica* pelo VITEK® 2 identificou as amostras como *S. marcescens* com alto percentual de confiança. Para avaliação dos biomarcadores da espécie *S. marcescens*, foram utilizadas as amostras (n=62) que exibiram score  $\geq 2.00$ , indicando 24 picos específicos. Também foram selecionadas as amostras identificadas como *S. ureilytica* com score  $\geq 2.00$ , e foi possível constatar a presença de 48 picos espécie-específico. Os picos encontrados apresentaram baixa intensidade. Altas taxas de resistência foram observadas para os aminoglicosídeos (n=41;39,7%), aztreonam (n=36;34,9%) e sulfametoxazol-trimetoprim (n=27;26,2%). Cerca de 1/3 das amostras foram multirresistentes. Em relação aos carbapenêmicos foi observada uma baixa taxa de resistência que variou de 1,9% a 15,5%. Apenas três (2,8%) amostras apresentaram produtos de amplificação compatíveis com o gene *bla*<sub>KPC</sub>, além de uma outra amostra que apresentou *bla*<sub>NDM</sub>. Não foi detectada a carbapenemase GES-16, enzima que teve sua primeira descrição em 2005 no mesmo hospital do estudo e cujo gene localizava-se em um plasmídeo não-conjugativo, podendo justificar a não disseminação no hospital do estudo. Os dados sugerem a importância de pesquisar outros mecanismos associados à resistência a carbapenêmicos. Os agrupamentos baseados nos espectros de massa apresentaram alta similaridade entre as amostras, e a árvore filoproteômica não mostrou discriminação entre *S. marcescens* e *S. ureilytica*, indicando uma grande proximidade entre elas. A identificação de *S. ureilytica* exclusivamente pelo MALDI TOF, em oposição às outras metodologias empregadas, chama a atenção para a dificuldade de identificação entre espécies com espectros proteicos muito próximos, sugerindo nesse caso o emprego do sequenciamento do genoma completo.

Palavras-chave: *Serratia* spp. Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry. Biomarcadores. Carbapenemase.

## ABSTRACT

FELÍCIO, Ingrid Macedo. **Phenotypic and molecular investigation of carbapenemases in *Serratia* spp.** 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

*Serratia* spp., commonly associated with healthcare-associated infections, it is capable of carrying a variety of genes that confer resistance to antimicrobials, representing an important challenge in terms of choosing the appropriate therapy. The objective of this study was to identify the species of *Serratia* spp., the presence of genes associated with resistance to carbapenems and to evaluate the relationship of similarity between the samples. A total of 103 samples isolated from patients treated at a university hospital between 2002 and 2020 were analyzed. Phenotypic identification was performed by biochemical tests, mass spectrometry and the VITEK®2 automated system. In addition, species-specific biomarkers were investigated by the analysis of the mass spectra. The antimicrobial susceptibility profile was determined by disk diffusion. The detection of genes encoding enzymes with carbapenemase activity (*bla*KPC, *bla*GES, *bla*NDM and *bla*OXA-48) was performed by PCR. The similarity between the samples was studied from the observation of the groupings graphically represented in dendrogram and phyloproteomic tree. All samples were identified as *Serratia marcescens* by biochemical tests. The results obtained by MALDI TOF showed that all samples were characterized by genus, 62 (60.1%) were identified as *S. marcescens* and 12 (11.6%) as *Serratia ureilytica*. Analysis of *S. ureilytica* by VITEK® 2 identified the samples as *S. marcescens* with high confidence. For the evaluation of biomarkers of the species *S. marcescens*, samples (n=62) that exhibited a score  $\geq 2.00$  were used, indicating 24 specific peaks. Samples identified as *S. ureilytica* with a score  $\geq 2.00$  were also selected, and it was possible to verify the presence of 48 species-specific peaks. The peaks found showed low intensity. High resistance rates were observed for aminoglycosides (n=41;39.7%), aztreonam (n=36;34.9%) and sulfamethoxazole-trimethoprim (n=27;26.2%). About 1/3 of the samples were multidrug resistant. Regarding carbapenems, a low resistance rate was observed, ranging from 1.9% to 15.5%. Only three (2.8%) samples showed amplification products compatible with the *bla*KPC gene, in addition to another sample that showed *bla*NDM. GES-16 carbapenemase was not detected, an enzyme that was first described in 2005 in the same hospital as the study and whose gene was located in a non-conjugative plasmid, which may justify its non-dissemination in the study hospital. The data suggest the importance of investigating other mechanisms associated with carbapenem resistance. The clusters based on mass spectra showed high similarity between the samples and the phyloproteomic tree, showing no discrimination between *S. marcescens* and *S. ureilytica*, indicating a great proximity between them. The identification of *S. ureilytica* exclusively by MALDI TOF, in opposition to the other methodologies used, draws attention to the difficulty of identification between species with very close protein spectra, suggesting in this case the use of whole genome sequencing.

Keywords: *Serratia* spp. Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry. Biomarkers. Carbapenemase.

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                        |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- | Classificação colorimétrica do percentual de variação de presença dos picos biomarcadores em amostras de <i>Serratia marcescens</i> e <i>Serratia ureilytica</i> ..... | 53 |
| Figura 2- | Dendrograma representando o percentual de proximidade entre as amostras de <i>Serratia marcescens</i> e <i>Serratia ureilytica</i> .....                               | 66 |
| Figura 3- | Árvore <i>Neighbor Joining</i> demonstrando a relação filoproteômica das amostras de <i>Serratia</i> spp.....                                                          | 72 |

## LISTA DE TABELAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 -  | Provas bioquímicas presentes nos cartões VITEK®2 GN e os poços correspondentes.....                                                                                                                                              | 33 |
| Tabela 2 -  | Condições da reação de PCR multiplex para detecção de genes de carbapenemases ( <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> ) .....                                                     | 36 |
| Tabela 3 -  | Condições da reação para PCR para detecção do gene de carbapenemase ( <i>bla</i> <sub>GES</sub> ) .....                                                                                                                          | 37 |
| Tabela 4 -  | Distribuição das 103 amostras de <i>Serratia</i> spp. incluídas no presente estudo, de acordo com o espécime clínico, data de coleta e origem clínica.....                                                                       | 40 |
| Tabela 5 -  | Identificação das amostras de <i>Serratia</i> spp. de acordo com o resultado da análise por espectrometria de massa e seus respectivos valores de <i>score</i> .....                                                             | 44 |
| Tabela 6 -  | Percentual de presença de biomarcadores espécie específicos em amostras de <i>Serratia</i> spp.....                                                                                                                              | 48 |
| Tabela 7 -  | Percentual de intensidade dos picos biomarcadores encontrados em cada espécie.....                                                                                                                                               | 50 |
| Tabela 8 -  | Comparação entre os resultados obtidos a partir da identificação por espectrometria de massa, pelo sistema VITEK®2 e por provas bioquímicas, utilizando as amostras caracterizadas como <i>S. ureilytica</i> pelo MALDI TOF..... | 56 |
| Tabela 9 -  | Taxas de resistência aos antimicrobianos determinadas pelo método de disco-difusão em amostras de <i>Serratia</i> spp.....                                                                                                       | 57 |
| Tabela 10 - | Distribuição das amostras conforme o perfil de resistência elaborado a partir dos resultados obtidos por disco-difusão.....                                                                                                      | 58 |
| Tabela 11 - | Perfis de similaridade baseados na tabela binária de biomarcadores.....                                                                                                                                                          | 61 |
| Tabela 12 - | Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras que exibiram genes codificadores de carbapenemase.....                                                                                                                  | 64 |
| Tabela 13 - | Perfil de similaridade entre as amostras e sua correlação com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....                                                                                                                  | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| AmpC      | Beta-lactamase do tipo AmpC                                        |
| BHI       | <i>Brain Heart Infusion Broth</i>                                  |
| BrCAST    | <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| CAB       | <i>Columbia Agar Base</i>                                          |
| CCBH      | Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar              |
| CCIH      | Comissão de Controle de Infecção Hospitalar                        |
| CFTR      | <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>         |
| CLED      | <i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar</i>                  |
| CTI       | Centro de Terapia Intensiva                                        |
| CTX-M     | <i>Cefotaximase-Munich</i>                                         |
| DNase     | Desoxirribonuclease                                                |
| dNTP      | Desoxinucleotídeo Trifosfatado                                     |
| EGM       | Elementos Genéticos Móveis                                         |
| ESBL      | <i>Extended Spectrum Beta-Lactamases</i>                           |
| FCM       | Faculdade de Ciências Médicas                                      |
| GES       | <i>Guiana Extended-Spectrum</i>                                    |
| HUPE      | Hospital Universitário Pedro Ernesto                               |
| IMP       | Beta-lactamase do tipo Imipenemase                                 |
| IRAS      | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde                       |
| KPC       | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase                         |
| LABACT    | Laboratório de Bacteriologia                                       |
| LabMiFC   | Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística                    |
| LAPIH     | Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar                     |
| MALDI TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light</i>   |
| MBL       | Metallo Beta-Lactamase                                             |
| MDR       | Multirresistente                                                   |
| NDM       | <i>New Delhi Metallo Beta-Lactamase</i>                            |
| OMS       | Organização Mundial da Saúde                                       |
| OXA-48    | Beta-lactamase do tipo Oxacilinase                                 |
| PBP       | <i>Penicillin-Binding Protein</i>                                  |

|       |                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------|
| PCR   | Reação em Cadeia da Polimerase                           |
| RNAr  | Ácido Ribonucleico Ribossômico                           |
| SHV   | Beta-lactamase do tipo SHV                               |
| TBE   | Tris/Borato/EDTA                                         |
| TEM   | Beta-lactamase do tipo TEM                               |
| TSA   | Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos               |
| UERJ  | Universidade do Estado do Rio de Janeiro                 |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> |
| UTI   | Unidade de Terapia Intensiva                             |
| VIM   | Verona Imipenemase                                       |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                   |                          |
|-------------------|--------------------------|
| %                 | Porcentagem              |
| °C                | Grau Celsius             |
| μL                | Microlitro               |
| ±                 | Mais ou menos            |
| H <sub>2</sub> S  | Sulfeto de hidrogênio    |
| mL                | Mililitro                |
| HCl               | Ácido Clorídrico         |
| N                 | Normal                   |
| Hz                | Hertz                    |
| Da                | Daltons                  |
| NaCl              | Cloreto de Sódio         |
| pH                | Potencial Hidrogeniônico |
| μg                | Micrograma               |
| rpm               | Rotações por minuto      |
| μM                | Micromolar               |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio      |
| g                 | Grama                    |
| V                 | Volt                     |
| mA                | Miliampère               |
| kb                | Kilobase                 |
| n                 | Número                   |
| <                 | Menor que                |
| ≥                 | Maior ou igual           |
| >                 | Maior que                |
| m/z               | Massa/carga              |

## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                                                                          |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                        | 15 |
| 1     | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                         | 24 |
| 1.1   | <b>Geral</b>                                                                                                                                                             | 24 |
| 1.2   | <b>Específicos</b>                                                                                                                                                       | 24 |
| 2     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                | 25 |
| 2.1   | <b>Amostras bacterianas e critério de seleção</b>                                                                                                                        | 25 |
| 2.2   | <b>Estoque bacteriano</b>                                                                                                                                                | 25 |
| 2.3   | <b>Reativação das amostras</b>                                                                                                                                           | 25 |
| 2.4   | <b>Identificação fenotípica</b>                                                                                                                                          | 26 |
| 2.4.1 | <u>Produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), indol e motilidade</u>                                                                                            | 26 |
| 2.4.2 | <u>Utilização do citrato</u>                                                                                                                                             | 27 |
| 2.4.3 | <u>Verificação do metabolismo</u>                                                                                                                                        | 27 |
| 2.4.4 | <u>Utilização dos carboidratos</u>                                                                                                                                       | 28 |
| 2.4.5 | <u>Verificação da atividade da urease</u>                                                                                                                                | 28 |
| 2.4.6 | <u>Utilização dos aminoácidos</u>                                                                                                                                        | 29 |
| 2.4.7 | <u>Verificação da atividade da enzima desoxirribonuclease</u>                                                                                                            | 29 |
| 2.5   | <b>Identificação por espectrometria de massa</b>                                                                                                                         | 30 |
| 2.5.1 | <u>Procedimento</u>                                                                                                                                                      | 30 |
| 2.5.2 | <u>Análise dos resultados da espectrometria de massa</u>                                                                                                                 | 30 |
| 2.6   | <b>Determinação de biomarcadores espécie específico</b>                                                                                                                  | 31 |
| 2.7   | <b>Identificação fenotípica por sistema automatizado VITEK® 2</b>                                                                                                        | 31 |
| 2.8   | <b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos</b>                                                                                                                        | 34 |
| 2.8.1 | <u>Teste de disco-difusão</u>                                                                                                                                            | 34 |
| 2.9   | <b>Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes <i>bla</i><sub>KPC</sub>, <i>bla</i><sub>NDM</sub>, <i>bla</i><sub>OXA-48</sub> e <i>bla</i><sub>GES</sub></b> | 35 |
| 2.9.1 | <u>Obtenção do DNA</u>                                                                                                                                                   | 35 |
| 2.9.2 | <u>Preparo das reações</u>                                                                                                                                               | 35 |
| 2.9.3 | <u>Eletroforese em gel de agarose</u>                                                                                                                                    | 37 |
| 2.10  | <b>Avaliação da formação de agrupamento segundo os espectros obtidos por espectrometria de massa</b>                                                                     | 38 |

|      |                                                                                                                                 |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3    | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                          | 39 |
| 3.1  | <b>Amostragem.....</b>                                                                                                          | 39 |
| 3.2  | <b>Identificação por metodologias fenotípicas.....</b>                                                                          | 43 |
| 3.3  | <b>Identificação por espectrometria de massa.....</b>                                                                           | 43 |
| 3.4  | <b>Deteção de biomarcadores.....</b>                                                                                            | 47 |
| 3.5  | <b>Identificação pelo sistema VITEK® 2.....</b>                                                                                 | 55 |
| 3.6  | <b>Comparação entre os resultados obtidos nos testes fenotípicos.....</b>                                                       | 55 |
| 3.7  | <b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....</b>                                                                          | 57 |
| 3.8  | <b>Correlação dos perfis de resistência aos antimicrobianos e os biomarcadores<br/>obtidos por espectrometria de massa.....</b> | 59 |
| 3.9  | <b>Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases.....</b>                                                                   | 63 |
| 3.10 | <b>Agrupamentos baseado nos espectros de massa obtidos entre <i>Serratia</i> spp.....</b>                                       | 65 |
| 4    | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                           | 73 |
|      | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                          | 80 |
|      | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                         | 82 |

## INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos ao longo dos anos trouxe consigo um grave problema de saúde pública. A utilização de antimicrobianos sem prescrição médica, desrespeitando a duração do tratamento e a dose, juntamente com a pressão seletiva dentro do ambiente hospitalar contribuíram para a seleção de microrganismos resistentes (ARANDA, *et al.*, 2020; CALLE-MIGUEL, *et al.*, 2021; LOUREIRO, *et al.*, 2016; SALDANHA; DE SOUZA; RIBEIRO, 2018).

Um microrganismo pode apresentar variados mecanismos de resistência, e estes podem estar localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, ou em elementos genéticos não móveis, como o cromossomo. A principal forma de transmissão de genes de resistência ocorre por meio da transferência horizontal através de plasmídeos, dessa forma, a disseminação pode acontecer mesmo entre microrganismos de espécies distintas (DE ALMEIDA, *et al.*, 2021; BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2018; ZAGONEL; ZAGONEL; OGLIARI, 2021).

Diversos patógenos da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella* spp., *E.coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp. foram considerados, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), microrganismos críticos em relação à resistência antimicrobiana, principalmente por apresentarem plasmídeos carreadores de genes de resistência aos carbapenêmicos, que são antimicrobianos de amplo espectro e utilizados, na maioria dos casos, como uma das últimas opções terapêuticas (ANGLES-YANQUI, *et al.*, 2020; FERRER, *et al.*, 2021; OMS, 2017; PFAENDLER; SCHMIDT; FREIDANK, 2020; WILSON; TÖRÖK, 2018).

Os carbapenêmicos integram a classe dos beta-lactâmicos, que são empregados em casos de infecções nosocomiais por microrganismos resistentes à cefalosporinas de terceira geração e penicilinas. Devido a utilização empírica e excessiva desses antimicrobianos, logo surgiram microrganismos resistentes, estes carregam genes que codificam enzimas chamadas carbapenemases, responsáveis pela hidrólise do anel beta-lactâmico (RIVERA-IZQUIERDO, *et al.*, 2021; VÁZQUEZ-UCHA, *et al.*, 2020).

Microrganismos do gênero *Serratia* spp. são frequentemente considerados multirresistentes (MDR), já que podem apresentar mecanismos de resistência ligados ao cromossomo, como bombas de efluxo e perda/diminuição de permeabilidade das porinas, além de carrear conjuntamente elementos genéticos móveis capazes de promover resistência a

diferentes classes de antimicrobianos, inclusive aos beta-lactâmicos (AGUILAR, 2013; MORADIGARAVAND, *et al.*, 2016; SANDNER-MIRANDA, *et al.*, 2018).

A presença de microrganismos como a *Serratia* spp., que são capazes de adquirir resistência aos carbapenêmicos por meio de plasmídeos e estão frequentemente associados a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), se tornou algo preocupante devido as escassas opções terapêuticas (MORADIGARAVAND, *et al.*, 2016; SANTOS; RIBEIRO, 2016). A antibioticoterapia para casos de Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos (ERC), é realizada com antimicrobianos que possuem combinação com inibidores de beta-lactamase, por exemplo ceftadizima-avibactam, além da polimixina B, que havia sido restringido devido à sua comprovada alta toxicidade (RODRIGUES, 2016; RODRIGUES, 2020; SUZUKI, *et al.*, 2020).

### ***Serratia* spp.**

### **Histórico**

Os microrganismos do gênero *Serratia* spp., são descritos como bacilos Gram-negativos, móveis, anaeróbios facultativos e algumas estirpes produzem o pigmento prodigiosina, que em culturas tornam as colônias avermelhadas. São comumente encontrados no solo, na água, em associação com plantas, insetos, animais e humanos (DOS SANTOS, 2020).

Foram relatadas até hoje 34 espécies desse gênero (LPSN, 2022), entre essas, algumas podem apresentar caráter patogênico, como a espécie *Serratia marcescens* que é geralmente a mais descrita em infecções humanas (PERES, 2017). Essa espécie foi retratada pela primeira vez em 1819 pelo farmacêutico Bartolomeo Bizio. Nessa época acreditava-se ser um microrganismo não patogênico. Em razão disso, foi utilizado em experimentos militares nos Estados Unidos da América (EUA), em diversos procedimentos médicos como marcador biológico e, também, como tratamento em casos de sarcoma (MAHLEN, 2011).

Outras espécies também têm sido envolvidas em infecções humanas, como por exemplo *Serratia liquefaciens*, em relatos de endocardite, infecções respiratórias e urinárias (IKUMAPAYI, *et al.*, 2016; MENEZES, *et al.*, 2004; MOMOSE, *et al.*, 2018). Apesar de

raramente ser observada em amostras clínicas, a espécie *Serratia rubidaea* foi isolada em casos de bacteremia e infecção urinária (GENTILE; PÉREZ; CENTELLES, 2014; KARKEY, *et al.*, 2018; MENEZES, *et al.*, 2004), assim como a espécie *Serratia plymuthica*, em relatos de osteomielite, sepse associada a cateter, ferida em caso de queimadura e celulite (CARRERO, *et al.*, 1995; CLARK; JANDA, 1985; HOROWITZ, *et al.*, 1987; PASCUAL, *et al.*, 2003; ZBINDEN; BLASS, 1988).

Em 2005 uma nova espécie do gênero *Serratia* spp., *Serratia ureilytica*, isolada a partir de amostras de água do rio Torsa, Índia, foi descrita. Essa espécie possui diferenças fenotípicas em relação à *S. marcescens*, como a capacidade de hidrólise da arginina e a utilização da uréia como única fonte de nitrogênio para o seu crescimento, propriedade que não é comumente encontrada em todas as amostras de *S. marcescens*. Além disso, existe atualmente apenas um relato de surto envolvendo humanos causado por essa espécie (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005; DAHDOUH, *et al.*, 2021).

### ***Serratia marcescens***

O primeiro relato de surto ocorreu em 1951 (WHEAT; ZUCKERMAN; RANTZ, 1951 apud MAHLEN, 2011), a partir disso, seu caráter patogênico e oportunista foi reconhecido, pois está presente principalmente em casos de infecções no ambiente hospitalar. Essa espécie é capaz de atingir diferentes sítios, como o trato respiratório causando pneumonia, o trato urinário, o sistema nervoso central, a corrente sanguínea provocando endocardite e septicemia. Por se tratar de uma bactéria oportunista, afeta principalmente pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), como neonatos e indivíduos imunocomprometidos (DOS SANTOS, 2020; PARENTE, 2010).

A transmissão nosocomial desse microrganismo pode ocorrer por meio de diferentes vias, através de dispositivos hospitalares, como cateteres e ventiladores mecânicos e, além disso, a disseminação também acontece mediante soluções desinfetantes contaminadas, que são componentes essenciais e utilizados em larga escala no ambiente hospitalar (DOS SANTOS; MARTINS, 2019; MARTINEAU, *et al.*, 2018; PARENTE, 2010).

Casos de surtos nosocomiais em unidades neonatais relacionados a *S. marcescens* tem sido descrito. Em 2018 foi publicado a ocorrência de um surto em UTI neonatal envolvendo oito neonatos e recém-nascidos com baixo peso, mostrando alta taxa de mortalidade (62,5%).

Outro caso relatado compreendeu sete neonatos com quadro de sepse, com desfecho de um óbito relacionado à contaminação da nutrição parenteral administrada nesses pacientes (ARSLAN, *et al.*, 2010; CRISTINA; SARTINIE; SPAGNOLO, 2019; DAOUDI, *et al.*, 2018).

Infecções associadas a *S. marcescens* produtoras de carbapenemases foram descritas. Numa UTI de adultos no sul da Itália, três pacientes foram acometidos por *S. marcescens* produtora de VIM, uma metalo beta-lactamase, e destes, dois vieram a óbito (IOVENE, *et al.*, 2019). No Brasil, em um hospital localizado em Palmas, no Tocantins, foram isoladas 54 amostras de *S. marcescens* de pacientes assistidos na UTI, e todas as amostras carregavam os genes codificadores de carbapenemase do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (*bla<sub>KPC</sub>*) e de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (*bla<sub>TEM</sub>*) (FERREIRA, *et al.*, 2020).

Microorganismos multirresistentes, como a *S. marcescens*, podem ser observados em quadros de IRAS, o que gera uma preocupação, visto que as opções de antimicrobianos eficazes para esses casos são limitadas (ALVIM; COUTO; GAZZINELLI, 2018; ARAÚJO; PEREIRA, 2017; COSTA, 2017; DE PAULA; DA COSTA, 2018).

### ***Serratia* spp. na fibrose cística**

A fibrose cística foi descrita em 1938 pela patologista Dorothy Andersen, é definida como uma doença genética autossômica recessiva com caráter sistêmico, podendo acometer diferentes órgãos, como pulmões, pâncreas e o sistema reprodutor. É causada por uma mutação no gene CFTR que codifica uma proteína de mesmo nome, responsável por realizar o transporte de íons na célula. Por conta da alteração nessa proteína, ocorre um desequilíbrio de íons no meio intra e extracelular, tornando as secreções mais espessas (ANDERSEN, 1938 apud DUARTE, 2017).

As infecções pulmonares de repetição são as apresentações clínicas mais comuns e a principal causa de óbito nesses indivíduos. Destacando-se como principais agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies do Complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*. Os raros casos descritos de espécies da família *Enterobacteriaceae* estão associados a presença de enzimas de resistência a antimicrobianos, como por exemplo KPC, entretanto, o real

significado clínico permanece desconhecido (ALMEIDA, 2016; BRAGA, 2016; DE MATOS, 2005; FÍRMIDA, 2016; LIMA, 2016; MARQUES, 2011; MARTINS; DOS SANTOS, 2006; VIANNA, 2017).

## **Identificação laboratorial**

Para realizar o diagnóstico laboratorial podem ser empregadas diversas técnicas tanto manuais quanto automatizadas. Atualmente, métodos convencionais manuais ainda são utilizados nos laboratórios devido ao baixo custo operacional, porém demandam tempo para exibir resultados (PERANTONI; QUEIROZ-FERNANDES, 2019; VILA, *et al.*, 2016).

A metodologia automatizada é utilizada em grande parte dos laboratórios clínicos, pois o emprego dessa técnica proporciona uma vantagem para o diagnóstico, por se tratar de uma metodologia padronizada e rápida. Além disso, é possível associar a identificação bacteriana ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (FERREIRA, 2017).

Com o avanço da tecnologia, técnicas moleculares estão sendo implantadas nos laboratórios clínicos com o objetivo de tornar o diagnóstico mais rápido. Dentre essas, a ferramenta *Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI TOF) se apresenta como um método automatizado de identificação bacteriana baseado na espectrometria de massa, tendo como foco as proteínas ribossomais. A identificação ocorre através da comparação dos picos gerados pela espectrometria, com aqueles encontrados em um banco de dados, e por meio dessa análise, é possível caracterizar o gênero, a espécie ou até mesmo enzimas de resistência (DE MELO, 2014; PATEL, 2015; SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017; SINGHAL, *et al.*, 2015).

A identificação bacteriana através desse método vem sendo empregada como uma alternativa mais acessível e menos laboriosa quando comparada a outras técnicas utilizadas para esse fim. Através da combinação desse processo com ferramentas de bioinformática, é possível analisar conjuntos de picos com o propósito de produzir perfis peptídicos, a fim de identificar picos biomarcadores característicos que representem um gênero ou espécie (CABRERA, 2017; DE MELO, 2014).

A utilização de técnicas cada vez mais avançadas contribuem para uma identificação mais precisa e ágil, fatores que são importantes principalmente em casos de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, já que nessas situações são observadas altas

taxas de morbidade e mortalidade. É necessário alto investimento para implantação desses métodos no laboratório clínico, visto que os equipamentos possuem alto custo, porém os benefícios proporcionados aos pacientes por tais metodologias excedem as despesas iniciais (PERANTONI; QUEIROZ-FERNANDES, 2019).

A análise realizada a partir do emprego do MALDI-TOF é capaz de gerar resultados confiáveis, porém, possui limitações, como a presença de um banco de dados restrito, já que sua manutenção é feita apenas pelo fabricante. Por conta disso, outras técnicas moleculares podem ser utilizadas como uma alternativa mais eficiente para a identificação de microrganismos que não são muito bem caracterizados pelas metodologias usuais, como por exemplo, o método de sequenciamento do gene RNAr 16S, conservado evolutivamente por possuir uma baixa taxa de mutação, característica importante para estudos taxonômicos (LAGIER, *et al.*, 2015).

### **Resistência a antimicrobianos em *Serratia* spp.**

A grande preocupação em relação aos microrganismos atualmente envolve questões referentes à resistência antimicrobiana (SADEK, *et al.*, 2022). *S. marcescens* apresenta resistência intrínseca a diferentes classes de antimicrobianos, como penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, algumas tetraciclinas (tetraciclina e doxiciclina), nitrofurantoína e polimixinas, esta é representativa dessa espécie, e está associada a modificações no lipopolissacarídeo (LPS), mediada pelos genes *arnB* e *arnC* reguladores do operon *arn* (BRCAS, 2020; LIN, *et al.*, 2014; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Também pode exibir resistência a outras classes, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, mediada principalmente por bombas de efluxo, representadas pelas seguintes famílias: *Multidrug And Toxic-compound Extrusion Family* (MATE), *Small Multidrug Resistance Family* (SMR), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Resistance Nodulation Division Family* (RND) e *ATP Binding Cassette Superfamily* (ABC) (LI, *et al.*, 2019; MARDANOVA, *et al.*, 2014).

Por ser um microrganismo oportunista e acometer pacientes imunocomprometidos, *S. marcescens* produtora de carbapenemase confere uma ameaça à saúde desses pacientes. Por meio de diversos relatos, é possível observar uma ampla gama de enzimas de resistência

associadas a essa espécie e sua distribuição mundial (HUANG, *et al.*, 2021; NAKANISHI, *et al.*, 2022).

As enzimas carbapenemases são responsáveis pela hidrólise de beta-lactâmicos da classe dos carbapenêmicos. Existe uma variedade de enzimas dessa categoria, e estas foram distribuídas em três classes principais segundo Ambler (1980). As enzimas da classe A (KPC, GES) e da classe D (OXA) possuem um sítio ativo de serina, já as enzimas da classe B (NDM, VIM, IPM) possuem o zinco como sítio ativo da enzima (AMBLER, 1980; BOUZERDAN, *et al.*, 2022). Além disso, já foi relatado um surto e casos isolados envolvendo *K. pneumonia* e *E. coli* que apresentaram a enzima AmpC (Classe C) com atividade de carbapenemase, enzima que é caracterizada como uma cefalosporinase (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002).

Em 2011 foi relatada em um estudo uma nova variante de GES com atividade de carbapenemase, GES-16 em *S. marcescens* proveniente de duas amostras isoladas em 2005 oriundas de um hospital universitário no Rio de Janeiro (BARBOSA, 2011). A variante GES-5 em *S. marcescens* foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2014 num hospital em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. A mesma variante foi isolada em 2020 no Japão, originária de um surto hospitalar em uma UTI (NAKANISHI, *et al.*, 2022; NODARI, *et al.*, 2017).

Foi descrito em 2021 o primeiro relato de endocardite envolvendo *S. marcescens* produtora de KPC (TILANUS; RINCON; RIVERA, 2021). Além disso, é possível isolar duas carbapenemases de classes distintas no mesmo microrganismo, como foi descrito em um trabalho publicado em 2021, acerca da associação entre as enzimas KPC-2 e NDM-1 em uma amostra sanguínea de *S. marcescens* em um hospital universitário de São Paulo (BES, *et al.*, 2021). Outros casos similares foram observados, com destaque para a primeira identificação de IMP-10 no Brasil e a combinação dessa enzima com KPC-2, relacionada a alta mortalidade (SILVA, *et al.*, 2015). Apesar dos relatos escassos de *S. marcescens* produtora de OXA-48, foi descrito um caso de surto em UTI no Irã, em associação com genes codificadores de ESBL (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, e *bla*<sub>TEM-1</sub>). As cinco amostras, isoladas de pacientes que compartilhavam o mesmo quarto, foram caracterizadas como pertencentes ao mesmo clone por metodologias de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (SOLGI, *et al.*, 2020).

## Aplicação do MALDI TOF para realização de agrupamentos

Além da identificação microbiana, existem estudos que sugerem o uso da técnica MALDI TOF para outras finalidades, como a tipagem bacteriana (CABRERA, 2017; RANGBERG, *et al.*, 2019; SAUGET, *et al.*, 2017; STEENSELS, *et al.*, 2017). Atualmente são empregados principalmente os métodos *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que apesar de desempenharem um papel eficiente e confiável, são metodologias laboriosas e que demandam um alto custo, por contrapor essas propriedades, MALDI TOF se tornou uma alternativa (CABRERA, 2017; KARGER, 2016).

Alguns estudos avaliaram o emprego desse método para tipagem, como foi o caso da análise de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) em um relato de surto numa UTI neonatal. Os resultados da espectrometria de massa em comparação com o PFGE sugeriram uma taxa de 93% de concordância (STEENSELS, *et al.*, 2017). Por outro lado, um estudo conduzido na China, (JIANG, *et al.*, 2019), avaliando a similaridade genética de 44 amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos utilizando PFGE e MALDI TOF, mostrou que este último teve um poder preditivo menor do que PFGE. Os autores concluíram que a espectrometria de massa não possui o poder discriminatório necessário para a determinação de clones de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, consequentemente, não pode ser considerado um método rápido e confiável para esse fim.

Algumas limitações em relação a técnica podem ser relacionadas, parcialmente, pela ausência de determinados picos ( $m/z$ ), pela técnica aplicada no processo de identificação bacteriana e extração dos dados, além da variação ou similaridade genética dentro dos gêneros (HUBER; REED; PATERSON, 2021; LÓPEZ-RAMOS, *et al.*, 2020).

## Justificativa

A emergência mundial de *S. marcescens* com característica de ser extensivamente resistente, e com importantes taxas de morbidade e mortalidade aliada à descrição de uma variante de GES, a GES-16, com atividade de carbapenemase em duas amostras isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE-UERJ, nos motivou a

investigar aspectos fenotípicos e as bases moleculares da resistência aos carbapenêmicos em amostras de *Serratia* spp. isoladas de pacientes atendidos no mesmo hospital, em período anterior e posterior a data de isolamento da amostra índice. Os resultados obtidos poderão contribuir para as estratégias terapêuticas, de prevenção e redução dos níveis de resistência.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Identificar as espécies e a presença de genes associados a resistência aos carbapenêmicos em *Serratia* spp. de origem clínica, e avaliar a formação de grupamentos por similaridade segundo os espectros obtidos por espectrometria de massa.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar as espécies do gênero *Serratia* spp. por metodologias fenotípicas, automatizadas e por espectrometria de massa;
- b) Avaliar a presença de peptídeos biomarcadores espécie específico através da espectrometria de massa;
- c) Agrupar as amostras baseado nos espectros de massa obtidos na espectrometria;
- d) Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;
- e) Investigar a presença de genes codificadores de carbapenemases.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras bacterianas e critério de seleção

Foram selecionadas 103 amostras de *Serratia* spp. provenientes de espécimes clínicos de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no período de julho de 2002 a novembro de 2020. Essas amostras foram obtidas de uma coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística (LabMiFC) da Disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UERJ. As amostras são oriundas da demanda espontânea das culturas encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia (LABACT) do HUPE – UERJ.

### 2.2 Estoque bacteriano

As amostras bacterianas obtidas da coleção de bactérias do LabMiFC foram preservadas em meio *Skim Milk* (DIFCO®, Hants, Inglaterra), com adição de 20% de glicerol e mantidas em freezer a -20°C até o momento da realização dos testes.

### 2.3 Reativação das amostras

A partir do estoque da coleção de bactérias, foi retirada uma alíquota de 10 µL e inoculada em Caldo Infuso de Cérebro e Coração – *Brain Heart Infusion Broth* – BHI (Becton Dickinson/BD®, Heidelberg, Alemanha), incubado sob constante agitação a 35±2°C por um período de aproximadamente 24 horas.

As amostras crescidas em BHI foram semeadas em meio ágar MacConkey (Kasvi®, Paraná, Brasil) com o intuito de selecionar apenas microrganismos Gram-negativos e

descartar possíveis contaminantes. As placas foram incubadas de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica.

Em seguida, as colônias isoladas foram semeadas em meio Columbia Agar Base – CAB (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha), incubadas de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$ , com o intuito de iniciar a identificação fenotípica através dos testes bioquímicos e conservar essas amostras em estoque.

## 2.4 Identificação fenotípica (OPLUSTIL, *et al.*, 2010).

### 2.4.1 Produção de sulfeto de hidrogênio, indol e motilidade

Para a observação das diferentes provas bioquímicas, foi utilizado o meio semissólido S.I.M Medium (Merck KGaA<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha). O meio foi semeado por picada até 2/3 de profundidade e incubado de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica. Após esse período, foi adicionado ao meio 3 a 4 gotas do reativo de Kovacs (Newprov<sup>®</sup>, Paraná, Brasil) para análise da produção de indol.

Se a superfície do meio apresentou um precipitado de coloração avermelhada logo após a adição do reagente de Kovacs, é um indicativo de que o microrganismo possui a enzima triptofanase, responsável pela hidrólise do triptofano, gerando indol. Caso tenha ocorrido produção de gás sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) a partir do tiosulfato de sódio, este reagirá com o citrato férrico amoniacal, produzindo o composto sulfato ferroso, responsável pela coloração escurecida do meio. Já a motilidade pode ser observada a partir do crescimento microbiano para além da área de inoculação no meio.

Como controle positivo da prova de produção do indol e da motilidade foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, e como controle negativo para os dois testes foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883. Como controle positivo para a produção de sulfeto de hidrogênio foi utilizada a cepa *Proteus mirabilis* ATCC<sup>®</sup> 7002, como controle negativo foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922.

#### 2.4.2 Utilização do citrato

Para realizar o teste foi utilizado o meio ágar Citrato Simmons (Kasvi<sup>®</sup>, Paraná, Brasil). Ao realizar a inoculação, o bisel foi semeado em linha reta com a agulha bacteriológica, e incubado por um período de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  em estufa bacteriológica. Ao utilizar o citrato presente no meio, é liberado  $\text{CO}_2$ , que combinado ao sódio e água, produz carbonato de sódio, uma substância alcalina, e quando em contato com o indicador de pH azul de bromotimol, será possível observar a cor azul ao longo do bisel. Foi utilizada como controle negativo a cepa *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, e para controle positivo foi utilizado a cepa *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883.

#### 2.4.3 Verificação do metabolismo

Foi utilizado o meio semissólido oxidação/fermentação (OF) (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha) com adição de 1% de dextrose (Reagen<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) em tubos sem e com o acréscimo de 1 mL de óleo mineral (Isofar<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil). Foram inoculados por meio de 3 a 4 picadas até 2/3 de profundidade dos tubos com e sem óleo, e incubados de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  em estufa bacteriológica. O meio contém glicose e o indicador de pH azul de bromotimol. A degradação da glicose torna o meio ácido, e a presença da coloração alaranjada é um indicativo de mudança do pH.

Microrganismos que apresentam o metabolismo oxidativo são aeróbios obrigatórios, pois são capazes apenas de degradar o açúcar na presença de oxigênio (tubo sem óleo). O metabolismo fermentativo está associado a microrganismos anaeróbios obrigatórios, pois o processo só ocorre na ausência de oxigênio (tubo com óleo). Além disso, também podem apresentar simultaneamente os dois metabolismos, sendo um microrganismo anaeróbio facultativo. *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 foi usada como controle para metabolismo oxidativo (aeróbio obrigatório), e *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como controle para metabolismo fermentativo (anaeróbio facultativo).

#### 2.4.4 Utilização de carboidratos

Para observar a fermentação de carboidratos, foi utilizado o caldo base vermelho fenol (Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) acrescido de 1% dos carboidratos de escolha (glicose (Reagen<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), lactose (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) e sacarose (Isofar<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) em tubos distintos. Após a inoculação das amostras com uma alçada de 1 µL, os tubos foram incubados de 18 a 24 horas a 35±2°C em estufa bacteriológica.

Por conta da presença do indicador de pH vermelho de fenol, ao fermentar os carboidratos ocorre a produção de produtos ácidos, provocando alterações no pH, por conta disso, a interpretação do teste pode ser feita através da observação da coloração fúcsia. *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 foi utilizada como controle positivo para a fermentação da glicose e lactose, já para a fermentação da sacarose foi utilizada a cepa *Proteus vulgaris* ATCC<sup>®</sup> 13315. Como controle negativo da fermentação de glicose, lactose e sacarose, foi utilizada *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853.

#### 2.4.5 Verificação da atividade da urease

Para realizar o teste, foi utilizado a base de ureia (Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) com acréscimo de 2% de ureia (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) esterilizada por meio de filtração. A amostra foi inoculada com auxílio de alça bacteriológica de 1 µL, e posteriormente incubada de 18 a 24 horas a 35±2°C em estufa bacteriológica. Em caso positivo do teste, é possível observar a cor fúcsia no meio decorrente da hidrólise da ureia e consequente produção de amônia, tornando o meio alcalino, revelado pelo indicador de pH vermelho de fenol. *P. vulgaris* ATCC<sup>®</sup> 13315 foi usado como controle positivo e *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como controle negativo.

#### 2.4.6 Utilização de aminoácidos

Para análise desse teste, foi utilizado o caldo base Moeller de descarboxilação (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha), acrescido de 1% dos aminoácidos de escolha, lisina (Isofar<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil), arginina (Isofar<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) e ornitina (INLAB<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), além do tubo sem a adição de aminoácidos, utilizado como controle do meio de cultura. Foi acrescentado 1 mL de óleo mineral (Isofar<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) em todos os tubos. A inoculação foi realizada com um volume de 1 µL e os tubos incubados de 18 a 24 horas a 35±2°C em estufa bacteriológica.

A interpretação do teste foi realizada através da observação da cor presente no meio. Caso exiba coloração violácea, significa que o aminoácido foi descarboxilado/hidrolisado já que liberou amina e tornou o meio alcalino, alterando o pH, sendo revelado pelo indicador púrpura de bromocresol. Como controle positivo para descarboxilação da lisina e hidrólise da arginina foi utilizado *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, e para descarboxilação da ornitina foi utilizado *P. mirabilis* ATCC<sup>®</sup> 7002. *P. vulgaris* ATCC<sup>®</sup> 13315 foi usado como controle negativo para os três aminoácidos.

#### 2.4.7 Verificação da atividade da enzima desoxirribonuclease

Foi utilizado para a realização do teste o meio ágar DNase (DIFCO<sup>®</sup>, Hants, Inglaterra). As amostras foram semeadas em pequenos círculos (*spots*) e incubadas por um período de 24 a 48 horas a 35±2°C em estufa bacteriológica. Após o crescimento, foi adicionado ácido clorídrico (HCl) 1N (Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) ao meio para revelação do teste. O teste foi considerado positivo a partir da observação de um halo transparente ao redor da amostra, indicando degradação do ácido nucleico (DNA), pois o ácido clorídrico provoca precipitação do DNA no meio. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923 e como controle negativo *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922.

## 2.5 Identificação por espectrometria de massa

### 2.5.1 Procedimento

As amostras foram semeadas em CAB (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha), e incubadas em estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas a 35±2°C. Em seguida, com o auxílio de um palito de madeira, uma colônia de cada amostra foi distribuída numa placa de aço inoxidável, com adição de 1 µL de ácido fórmico 98%, e 1 µL de solução matricial saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup>, Leipzig, Alemanha). Após esse processo, a placa de aço inoxidável foi colocada em estufa bacteriológica até secagem total da solução (UHLIK, *et al.*, 2011).

Para determinar a espectrometria de massa, a placa foi inserida no equipamento Microflex LT - Bruker Daltonics MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup>, Leipzig, Alemanha), que opera com um laser linear positivo com frequência de 60Hz e um intervalo de massas entre 2.000 e 20.000 Daltons. Os picos foram detectados pelo sistema Módulo FlexControl™ v.3.3 (Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup>, Leipzig, Alemanha) e posteriormente processados utilizando o programa MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup>, Leipzig, Alemanha) (BIER, *et al.*, 2017).

### 2.5.2 Análise dos resultados da espectrometria de massa

Os picos verificados pelo sistema Módulo flexAnalysis™ v.3.3 (Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup>, Leipzig, Alemanha) foram comparados com um banco de dados de referência e a partir disso foi gerado um *score* de classificação.

Os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações do fabricante, pontuações com valores iguais ou acima de 2.00 são de alta confiança e permitem classificar as amostras a nível de espécie; pontuações que variam de 1.70 a 1.99 são de baixa confiança para identificação a nível de espécie, e permitem a classificação apenas a nível de gênero; as pontuações inferiores a 1.70 não permitem uma identificação confiável. Para realizar o controle da técnica foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 (ROCCA, *et al.*, 2020).

## 2.6 Determinação de biomarcadores espécie específico

Os espectros de massa peptídica obtidos na técnica de MALDI TOF foram submetidos ao programa *BioNumerics*<sup>®</sup> v7.6.2 (Applied Maths<sup>®</sup>, Sint-Martens-Laten, Bélgica), onde os espectros brutos foram pré-processados e normalizados usando parâmetros padrão (a subtração da linha de base foi realizada com o *Running Rolling disc*, e o pico a detecção foi realizado usando uma relação sinal / ruído de 10) (PINTO, *et al*, 2017).

Após o pré-processamento, os espectros foram submetidos ao pico correspondência, as amostras foram agrupadas de acordo com a classificação de espécie, conforme os resultados obtidos pela espectrometria de massa. Em seguida, as 62 amostras correspondentes à espécie *S. marcescens* foram selecionadas e submetidas a opção “*Recreate peak classes*”, sendo possível visualizar os picos, assim como as 12 amostras classificadas como *S. ureilytica*. O pico correspondência foi realizado conforme os seguintes parâmetros: constante de tolerância = 0,5; tolerância linear = 300; deslocamento horizontal máximo = 1; taxa de detecção de pico = 70 (COLODETTE, 2019). Os picos gerados foram avaliados a fim de determinar biomarcadores específicos para caracterização de espécie (PINTO, *et al*, 2017).

## 2.7 Identificação fenotípica por sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2

As amostras foram semeadas em ágar CLED (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha), incubadas em estufa bacteriológica a 35±2°C por um período de 18 a 24 horas. Suspensões bacterianas foram preparadas com colônias isoladas de cada amostra em 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,45%) (Vyaire Medical<sup>®</sup>, Mettawa, Estados Unidos) em tubos de acrílico, e a densidade das suspensões foi avaliada através do fotocolorímetro Densichek plus (BioMérieux<sup>®</sup>, Marcy l’Etoile, França), seguindo o padrão de turvação 0,5 – 0,63 na escala McFarland (RAMOS, 2014).

Posteriormente, os cartões VITEK<sup>®</sup> 2 GN (BioMérieux<sup>®</sup>, Marcy l’Etoile, França) foram alocados nos cassetes e associados às suspensões. Em seguida, os cartões constituídos por 47 provas bioquímicas foram inseridos no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT 60 (Tabela 1). Os poços contendo as provas bioquímicas foram então irradiados por feixes de

luz, e a interpretação dos resultados se deu conforme as alterações colorimétricas resultantes da mudança de pH. A análise foi acompanhada por meio do sistema de gerenciamento de dados OBSERVA (BioMérieux<sup>®</sup>, Marcy l'Etoile, França) versão 4.4 (BASSANI, 2018; FERREIRA, 2017; RAMOS, 2014; SILVA, 2020).

Seguindo as recomendações do fabricante, as amostras foram identificadas com uma probabilidade de precisão de 95% a 99%, e o nível de confiança desses resultados variou de “muito boa identificação” a “excelente identificação”.

Tabela 1- Provas bioquímicas presentes nos cartões VITEK® 2 GN e os poços correspondentes

| Poço | Testes bioquímicos            | Abreviatura      | Poço | Testes bioquímicos               | Abreviatura |
|------|-------------------------------|------------------|------|----------------------------------|-------------|
| 2    | Ala-Fe-pro-Arilamidase        | APPA             | 33   | Sacarose / Sucrose               | SAC         |
| 3    | Adonitol                      | ADO              | 34   | D-Tagatose                       | dTAG        |
| 4    | L-Pirrolidonil – Arilamidase  | PyrA             | 35   | D-Trealose                       | dTRE        |
| 5    | L-Arabitól                    | IARL             | 36   | Citrato (sódio)                  | CIT         |
| 7    | D-Celobiose                   | Dcel             | 37   | Malonato                         | MNT         |
| 9    | Beta-Galactosidase            | BGAL             | 39   | 5-Queto-D-Gluconato              | 5KG         |
| 10   | Produção de H <sub>2</sub> S  | H <sub>2</sub> S | 40   | Alcalinização L-Lactato          | ILATk       |
| 11   | Beta-N-Acetil-Glucosaminidase | BNAG             | 41   | Alfa-Glucosidase                 | AGLU        |
| 12   | Glutamil Arilamidase pNA      | AGLTp            | 42   | Alcalinização Succinato          | SUCT        |
| 13   | D-Glucose                     | dGLU             | 43   | Beta-N-Acetil-Glucosaminidase    | NAGA        |
| 14   | Gama-Glutamil-Transferase     | GGT              | 44   | Alfa-Galactosidase               | AGAL        |
| 15   | Fermentação / Glicose         | OFF              | 45   | Fosfatase                        | PHOS        |
| 17   | Beta-Glucosidase              | BGLU             | 46   | Assimilação Glicina Arilamidase  | GlyA        |
| 18   | D-Maltose                     | dMAL             | 47   | Ornitina descarboxilase          | ODC         |
| 19   | D-Manitol                     | dMAN             | 48   | Lisina descarboxilase            | LDC         |
| 20   | D-Manose                      | dMNE             | 53   | Assimilação L-histidina          | IHISa       |
| 21   | Beta-xilosidase               | BXYL             | 56   | Cumarato                         | CMT         |
| 22   | Beta-Alanina arilamidase pNA  | BAlap            | 57   | Beta-Glucoronidase               | BGUR        |
| 23   | L-Prolina Arilamidase         | ProA             | 58   | Resistência O/129 (comp. vibrio) | O129R       |
| 26   | Lipase                        | LIP              | 59   | Glu-Gli-Arg-Arilamidase          | GGAA        |
| 27   | Palatinose                    | PLE              | 61   | Assimilação L-Malato             | IMLTa       |
| 29   | Tirosina Arilamidase          | TyrA             | 62   | ELLMAN                           | ELLM        |
| 31   | Urease                        | URE              | 64   | Assimilação L-Lactato            | ILATa       |
| 32   | D-Sorbitol                    | dSOR             |      |                                  |             |

Fonte: Adaptado de BASSANI, 2018.

## 2.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

### 2.8.1 Teste de disco-difusão

O método de disco-difusão foi executado segundo as recomendações e critérios interpretativos estabelecidos pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – BrCAST (2019). Antes de iniciar o procedimento, os discos foram retirados do freezer por no mínimo 20 minutos até atingirem a temperatura ambiente. Foram selecionadas colônias isoladas e inoculadas em solução salina estéril a 0,9%, com o intuito de gerar uma suspensão bacteriana com turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland.

Posteriormente, um *swab* de algodão foi imerso na suspensão bacteriana e o excesso retirado na parede do tubo. Em seguida, a alíquota foi semeada em meio de cultura ágar Mueller Hinton (Kasvi<sup>®</sup>, Paraná, Brasil), com espalhamento em todas as direções da superfície. Após esse processo, os discos foram aplicados em até 15 minutos após a semeadura da placa, e logo depois incubadas em estufa bacteriológica de 18 a 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  (BRCAST, 2019).

Para a interpretação do teste, foi mensurado com o auxílio de uma régua o diâmetro do halo de inibição de cada antimicrobiano e consultada a tabela de pontos de corte clínico disponibilizada pelo BrCAST, a fim de determinar se o microrganismo é sensível, sensível aumentando exposição ou resistente aos antimicrobianos utilizados no teste. A partir dessa classificação, foi possível determinar se as amostras eram multirresistentes (MDR), que foi definido como um microrganismo resistente a pelo menos um antimicrobiano em três classes ou mais (BRCAST, 2019; MAGIORAKOS, *et al.*, 2012).

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: meropenem (MER) 10 µg (Cefar<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), imipenem (IPM) 10 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Hampshire, Reino Unido), ertapenem (ETP) 10 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Hampshire, Reino Unido), amicacina (AK) 30 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Hampshire, Reino Unido), gentamicina (GEN) 10 µg (Cefar<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), ciprofloxacina (CIP) 5 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Hampshire, Reino Unido), aztreonam (ATM) 30 µg (Cefar<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) 25 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Hampshire, Reino Unido). A cepa *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 foi utilizada como controle para os antimicrobianos (BRCAST, 2019).

## 2.9 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>GES</sub>*

### 2.9.1 Obtenção do DNA

A partir de uma cultura recente em Mueller Hinton (BD<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha), foi feita uma suspensão em tubo médio de 1,5 mL tipo Eppendorf<sup>®</sup> contendo 500 µL de água nuclease free estéril (Invitrogen<sup>®</sup>, Grand Island, Estados Unidos) e agitadas em Vortex (Daigger<sup>®</sup>, New Jersey, Estados Unidos). Em seguida, as suspensões bacterianas foram colocadas em cuba de ultrassom (Cristófoli<sup>®</sup>, Paraná, Brasil) por 3 ciclos de 30 segundos, sendo os tubos homogeneizados a cada ciclo. Por fim, os tubos foram levados para a centrífuga (Heraeus<sup>®</sup>, Hanau, Alemanha) por 3 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm) (DAI, *et al.*, 2016).

### 2.9.2 Preparo das reações

Ao realizar a PCR multiplex para pesquisa dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*, foi adicionado em um tubo médio de 1,5 mL tipo Eppendorf<sup>®</sup> 0,5 µL de cada primer (3 *forward* e 3 *reverse*) com concentração de 0.2 µM, 7,5 µL de água nuclease *free* estéril (Invitrogen<sup>®</sup>, Grand Island, Estados Unidos) e 12,5 µL de GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), [enzima *Taq* DNA polimerase, desoxinucleotídeo trifosfatado – dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), tampão de reação (pH 8.5) e uma mistura de dois corantes (azul e amarelo)]. Foram distribuídos 23 µL da reação em microtubos de 0,2 mL tipo Eppendorf<sup>®</sup>, e posteriormente foi adicionado 2 µL de DNA extraído, dessa forma o volume final da reação foi de 25 µL (AUSUBEL, *et al.*, 1987; MONTEIRO, *et al.*, 2012; NAAS, *et al.*, 2008; NORDMANN, *et al.*, 2011).

Para a pesquisa do gene codificador de carbapenemase *bla<sub>GES</sub>*, foi adicionado em um tubo médio de 1,5 mL tipo Eppendorf<sup>®</sup> 0,75 µL de cada iniciador (*forward* e *reverse*) com concentração de 0.2 µM, 9 µL de água nuclease *free* estéril (Invitrogen<sup>®</sup>, Grand Island, Estados Unidos) e 12,5 µL de GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin,

Estados Unidos). Foram distribuídos 23 µL da reação em microtubos de 0,2 mL tipo Eppendorf®, e em seguida foi acrescentado 2 µL de DNA extraído, dessa forma o volume final da reação foi de 25 µL (AUSUBEL, *et al.*, 1987; MONTEIRO, *et al.*, 2012; NAAS, *et al.*, 2008; NORDMANN, *et al.*, 2011).

Para realizar os testes, foram utilizadas como controle positivo dos genes investigados as seguintes amostras da coleção de culturas de bactérias de origem hospitalar (CCBH) do laboratório de infecção hospitalar (LAPIH) da Fundação Oswaldo Cruz: *bla*<sub>KPC-2</sub> – CCBH 6556, *bla*<sub>NDM</sub> – CCBH 16302, *bla*<sub>OXA-48</sub> – CCBH 10079 e *bla*<sub>GES</sub> – CCBH 26696.

A reação foi amplificada em termociclador TC-9639 (Loccus®, Cotia, São Paulo, Brasil) e DNA Engine (Bio-rad®, Califórnia, Estados Unidos) em condições diferentes (Tabela 2) (Tabela 3). Para realizar o PCR foram utilizados os iniciadores para *bla*<sub>KPC</sub> (785pb): KPC-F (TCGCTAACTCGAAACAGG), KPC-R (TTACTGCCCCGTTGACGCCAATCC); para *bla*<sub>NDM</sub> (345pb): NDM-F (CGAAGCTGAGCACCGCATA), NDM-R (ATCTTGCCCTGATGCGCGTG); para *bla*<sub>OXA-48</sub> (177pb): OXA-48-F (TGTTTTTGGTGGCATCGAT), OXA-48-R (GTAAMRATGCTTGGTTCGC); e para *bla*<sub>GES</sub> (594pb): GES-F (CTATTACTGGCAGGGATCG) e GES-R (CCTCTCAATGGTGTGGGT) (MONTEIRO, *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Condições da reação de PCR multiplex para detecção de genes de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>)

| Reagentes                  | Quantidade por amostra          | Condições da reação      |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Água nuclease free estéril | 7,5µL                           | 1 ciclo: 94°C - 5min.    |
| GoTaq® Green Master Mix    | 12,5µL                          | 30 ciclos: 94°C - 45seg. |
| Iniciadores                | 0,5µL de cada iniciador (F e R) | 60°C - 45seg.            |
| DNA                        | 2µL                             | 72°C - 45seg.            |
| Volume final da reação     | 25µL                            | 1 ciclo: 72°C - 5min.    |

Legenda: F- Forward; R - Reverse.

Fonte: Adaptado de MONTEIRO, *et al.*, 2012.

Tabela 3 - Condições da reação para PCR para detecção do gene de carbapenemase (*bla<sub>GES</sub>*)

| Reagentes                  | Quantidade por amostra           | Condições da reação     |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Água nuclease free estéril | 9µL                              | 1 ciclo: 94°C - 5min.   |
| GoTaq® Green Master Mix    | 12,5µL                           | 30 ciclos: 94°C - 1min. |
| Iniciadores                | 0,75µL de cada iniciador (F e R) | 50°C - 1min             |
| DNA                        | 2µL                              | 72°C - 1min             |
| Volume final da reação     | 25µL                             | 1 ciclo: 72°C - 5min.   |

Legenda: F- Forward; R - Reverse.

Fonte: Adaptado de MONTEIRO, *et al.*, 2012.

### 2.9.3 Eletroforese em gel de agarose

Para realizar a eletroforese, inicialmente foi preparado 100 mL de gel de agarose a partir de 100 mL de tampão TBE 0,4x acrescido de 1,5 g de agarose ultrapura (Gibco BRL®, Califórnia, Estados Unidos), e após a homogeneização foi acrescentado 10 µL de SYBR Safe (Invitrogen®, Grand Island, Estados Unidos). O gel foi vertido em cuba de eletroforese, após a solidificação foi adicionado o tampão TBE 0,4x na cuba, e posteriormente foi aplicado 6 µL do produto de PCR em cada poço. A corrida eletroforética em cuba horizontal (Loccus®, São Paulo, Brasil) ocorreu a 110 volts (V), 400 miliampère (mA) por 35 minutos (LEE, *et al.*, 2012).

O gel foi visualizado e fotografado utilizando o transiluminador MiniBis Pro (DNR®, Neve Yamin, Israel) de luz ultravioleta e um sistema computadorizado de foto documentação. O tamanho das sequências foi comparado com o padrão de peso molecular *ladder* 1kb (Invitrogen®, Grand Island, Estados Unidos) utilizado na corrida (LEE, *et al.*, 2012).

## 2.10 Avaliação da formação de agrupamento segundo os espectros obtidos por espectrometria de massa

Os espectros obtidos a partir da metodologia MALDI TOF foram exportados para o software *BioNumerics*<sup>®</sup> v7.6.2 (Applied Maths<sup>®</sup>), onde foram pré processados e normalizados (COLODETTE, 2019). Um dos objetivos foi gerar um dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de *Dice* em conjunto com o método UPGMA. Além disso, também foi elaborada uma árvore, sem raízes, usando o coeficiente de correlação de *Pearson* e o algoritmo de *Neighbor joining*. Essas duas representações gráficas foram utilizadas com o intuito de realizar um grupamento das amostras baseado nos espectros de massa, a fim de demonstrar o percentual e a relação de proximidade entre as linhagens (FARIA, *et al.*, 2012; PINTO, *et al.*, 2017; RÖDEL, *et al.*, 2019).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Amostragem

Foram selecionadas 103 amostras de *Serratia* spp. a partir da coleção de culturas obtidas de pacientes com (n= 9) e sem FC (n= 94) assistidos em diferentes unidades hospitalares do HUPE. A maioria das amostras foi originária do Centro de Terapia Intensiva (CTI) geral (13,6%) e da nefrologia (10,7%). Essas amostras foram oriundas de diversos espécimes biológicos, como sangue (61,2%), aspirado/secreção traqueal (13,6%), escarro (11,7%), urina (3%), material fibrinoso do pulmão (2%), ponta de cateter (1%), abscesso (1%), secreção purulenta (1%), secreção de ferida (1%), secreção brônquica (1%) e crosta da cavidade nasal (1%).

As amostras foram distribuídas de modo heterogêneo ao longo dos anos, com maior concentração nos anos 2019 (n= 27), 2011 (n= 18), 2014 (n= 12) e 2020 (n= 10). Os espécimes clínicos mais numerosos não foram observados de forma regular no decorrer dos anos, amostras de sangue se concentraram em 2019 (n= 17), de aspirado/secreção traqueal em 2014 (n= 6) e de escarro em 2019 (n= 6) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das 103 amostras de *Serratia* spp. incluídas no presente estudo, de acordo com o espécime clínico, data de coleta e origem clínica (continua)

| Amostra       | FC/NFC | Data da coleta | Material         | Clínica       | Amostra      | FC/NFC | Data da coleta | Material                     | Clínica        |
|---------------|--------|----------------|------------------|---------------|--------------|--------|----------------|------------------------------|----------------|
| <b>2956</b>   | NCF    | 11/07/2002     | Sangue           | Enf. 17       | <b>12872</b> | NFC    | 30/05/2011     | Sangue                       | Nefrologia     |
| <b>3154</b>   | NFC    | 23/10/2002     | Ponta de cateter | Nefrologia    | <b>12874</b> | NFC    | 25/05/2011     | Sec. traqueal                | CTI Geral      |
| <b>3581</b>   | NFC    | 13/09/2003     | Sangue           | UTI neonatal  | <b>12993</b> | NFC    | 09/06/2011     | Sec. traqueal                | CTI Geral      |
| <b>4190</b>   | FC     | 01/07/2004     | Escarro          | IFF           | <b>12994</b> | NFC    | 09/06/2011     | Sec. traqueal                | CTI Geral      |
| <b>5798</b>   | NFC    | 24/11/2006     | Sangue           | Urologia      | <b>13004</b> | NFC    | 02/06/2011     | Crosta cavidade nasal (peça) | ORL            |
| <b>6696 A</b> | NFC    | 17/10/2007     | Sangue           | Cardiologia   | <b>13435</b> | NFC    | 05/08/2011     | Sangue                       | Nefrologia     |
| <b>6696 B</b> | NFC    | 17/10/2007     | Sangue           | Cardiologia   | <b>13462</b> | NFC    | 10/08/2011     | Urina                        | AMI            |
| <b>6946</b>   | NFC    | 27/11/2007     | Sangue           | Nefrologia    | <b>13532</b> | NFC    | 20/06/2011     | Sangue                       | CTI Geral      |
| <b>6947</b>   | NFC    | 02/01/2008     | Sangue           | UTI neonatal  | <b>13545</b> | NFC    | 23/06/2011     | Sec. traqueal                | Nefrologia     |
| <b>6957</b>   | NFC    | 11/12/2007     | Sangue           | Cir. Cardíaca | <b>13547</b> | NFC    | 23/06/2011     | Sec. traqueal                | CTI Geral      |
| <b>7105</b>   | NFC    | 21/02/2008     | Sangue           | Nefrologia    | <b>13595</b> | FC     | 06/07/2011     | Escarro                      | PPC            |
| <b>7106</b>   | NFC    | 22/02/2008     | Sangue           | Nefrologia    | <b>13648</b> | NFC    | 19/07/2011     | Sangue                       | Hematologia    |
| <b>7145</b>   | NFC    | 25/02/2008     | Sangue           | Cardiologia   | <b>14508</b> | NFC    | 08/05/2012     | Sangue                       | CTI Geral      |
| <b>7183</b>   | NFC    | *              | Sangue           | Nefrologia    | <b>14519</b> | NFC    | 20/05/2012     | Sangue                       | Nefrologia     |
| <b>7192</b>   | NFC    | 10/03/2008     | Sangue           | Hemodiálise   | <b>14870</b> | NFC    | 05/08/2012     | Sangue                       | U. Coronariana |
| <b>7456</b>   | NFC    | 18/03/2008     | Sangue           | Hemodiálise   | <b>14928</b> | NFC    | 18/07/2012     | Urina                        | NESA           |
| <b>7771</b>   | *      | 07/07/2008     | Sangue           | *             | <b>15366</b> | NFC    | 09/10/2012     | Urina                        | Enf. 11        |
| <b>11424</b>  | NFC    | 11/01/2011     | Sec. traqueal    | CTI Geral     | <b>16089</b> | NFC    | 21/02/2013     | Sangue                       | CTI Cardíaco   |
| <b>11740</b>  | NFC    | 08/02/2011     | Sangue           | CTI Geral     | <b>16187</b> | NFC    | 19/03/2013     | Sangue                       | CTI Geral      |
| <b>11979</b>  | NFC    | 01/03/2011     | Sangue           | Hemodiálise   | <b>16261</b> | NFC    | 19/03/2013     | Sangue                       | CTI Geral      |
| <b>12076</b>  | NFC    | 16/05/2011     | Sec. traqueal    | UCIPG         | <b>16467</b> | NFC    | 03/06/2013     | Sec. traqueal                | UCIPG          |
| <b>12678</b>  | NFC    | 26/04/2011     | Sangue           | NESA          | <b>17397</b> | NFC    | 21/01/2014     | Sec. traqueal                | Enf. 14        |
| <b>12698</b>  | NFC    | 29/04/2011     | Sec. ferida      | Enf.          | <b>17657</b> | NFC    | 21/03/2014     | Sangue                       | Enf. 15        |

Tabela 4 – Distribuição das 103 amostras de *Serratia* spp. incluídas no presente estudo, de acordo com o espécime clínico, data de coleta e origem clínica (continuação)

| Amostra        | FC/NFC | Data da coleta | Material                | Clínica        | Amostra      | FC/NFC | Data da coleta | Material      | Clínica        |
|----------------|--------|----------------|-------------------------|----------------|--------------|--------|----------------|---------------|----------------|
| <b>17763</b>   | NFC    | 03/04/2014     | Sangue                  | CTI Geral      | <b>22356</b> | NFC    | 22/08/2019     | Sangue        | UI cirúrgica   |
| <b>17805</b>   | NFC    | 14/04/2014     | Sangue                  | Enf. 18        | <b>22357</b> | NFC    | 22/08/2019     | Sangue        | UI             |
| <b>17852</b>   | NFC    | 29/04/2014     | Sec. Traqueal           | DIP            | <b>22358</b> | NFC    | 23/08/2019     | Sangue        | PG             |
| <b>17908</b>   | NFC    | 08/05/2014     | Sec. Traqueal           | CTI Geral      | <b>22401</b> | NFC    | 12/09/2019     | Sangue        | U. coronariana |
| <b>17949</b>   | NFC    | 20/05/2014     | Sec. Traqueal           | Clínica Médica | <b>22407</b> | NFC    | 09/09/2019     | Sangue        | Neurologia     |
| <b>18054</b>   | NFC    | 03/08/2014     | Sangue                  | Cir. Geral     | <b>22408</b> | NFC    | 10/09/2019     | Escarro       | Pneumologia    |
| <b>18101</b>   | NFC    | 14/06/2014     | Sangue                  | UI             | <b>22426</b> | NFC    | 25/09/2019     | Asp. traqueal | Enf. 03        |
| <b>18653</b>   | NFC    | 08/11/2014     | Sec. Purulenta          | Urologia       | <b>22427</b> | NFC    | 25/09/2019     | Asp. traqueal | Enf. 03        |
| <b>18672</b>   | NFC    | 11/11/2014     | Sec. Traqueal           | CTI Geral      | <b>22428</b> | *      | 25/09/2019     | Escarro       | *              |
| <b>18752</b>   | NFC    | 02/12/2014     | Sec. Traqueal           | CTI Geral      | <b>22437</b> | FC     | 25/09/2019     | Escarro       | HUPE/INT/FC    |
| <b>19382</b>   | FC     | 30/03/2015     | Escarro                 | IFF            | <b>22438</b> | FC     | 25/09/2019     | Escarro       | HUPE/INT/FC    |
| <b>19793 A</b> | NFC    | 10/07/2015     | Mat. fibrinoso pulmão D | Cir. Torácica  | <b>22450</b> | NFC    | 02/10/2019     | Sangue        | Cardiologia    |
| <b>19793 B</b> | NFC    | 10/07/2015     | Mat. fibrinoso pulmão D | Cir. Torácica  | <b>22454</b> | NFC    | 03/10/2019     | Sec. abscesso | CTI cardíaco   |
| <b>20195</b>   | FC     | 20/10/2015     | Escarro                 | IFF            | <b>22461</b> | NFC    | 08/10/2019     | Sangue        | Nefrologia     |
| <b>21186</b>   | FC     | 04/07/2017     | Escarro                 | IFF            | <b>22466</b> | NFC    | 07/10/2019     | Escarro       | Pneumologia    |
| <b>21795</b>   | NFC    | 14/08/2018     | Sangue                  | Enf. 11        | <b>22470</b> | FC     | 11/10/2019     | Escarro       | PPC            |
| <b>21796</b>   | NFC    | 14/08/2018     | Sangue                  | Enf. 11        | <b>22472</b> | NFC    | 09/10/2019     | Sangue        | PG             |
| <b>21854</b>   | NFC    | 03/09/2018     | Sangue                  | Enf.           | <b>22473</b> | NFC    | 01/10/2019     | Sangue        | Pediatria      |
| <b>21901</b>   | FC     | 20/09/2018     | Escarro                 | IFF            | <b>22474</b> | NFC    | 08/10/2019     | Sangue        | Nefrologia     |
| <b>22173</b>   | NFC    | 26/06/2019     | Sangue                  | Cardiologia    | <b>22501</b> | NFC    | 08/11/2019     | Sangue        | UI cirúrgica   |
| <b>22184</b>   | NFC    | 11/07/2019     | Sangue                  | Cardiologia    | <b>22521</b> | NFC    | 13/11/2019     | Sangue        | UTI pediátrica |
| <b>21921</b>   | NFC    | 01/10/2018     | Sangue                  | UCIPG          | <b>22522</b> | NFC    | 22/11/2019     | Sangue        | Enf. 17        |
| <b>22283</b>   | NFC    | 06/08/2019     | Aspirado traqueal       | UTI neonatal   | <b>22531</b> | NFC    | 22/11/2019     | Sangue        | UI cirúrgica   |

Tabela 4 – Distribuição das 103 amostras de *Serratia* spp. incluídas no presente estudo, de acordo com o espécime clínico, data de coleta e origem clínica (conclusão)

| Amostra      | FC/NFC | Data da coleta | Material | Clínica        | Amostra      | FC/NFC | Data da coleta | Material      | Clínica        |
|--------------|--------|----------------|----------|----------------|--------------|--------|----------------|---------------|----------------|
| <b>22556</b> | NFC    | 12/12/2019     | Sangue   | Dermato. Enf.  | <b>22780</b> | NFC    | 27/07/2020     | Sangue        | U. coronariana |
| <b>22594</b> | NFC    | 23/01/2020     | Sangue   | CTI cardíaco   | <b>22781</b> | NFC    | 21/10/2020     | Asp. traqueal | UTI covid 2    |
| <b>22623</b> | NFC    | 29/01/2020     | Sangue   | UTI neonatal   | <b>22782</b> | NFC    | 05/11/2020     | Sangue        | Neurocirurgia  |
| <b>22779</b> | NFC    | 20/05/2020     | Sangue   | Covid          | <b>22783</b> | NFC    | 12/11/2020     | Sangue        | U. coronariana |
| <b>22777</b> | NFC    | 25/05/2020     | Sangue   | Enf-17/18      | <b>22784</b> | NFC    | 12/11/2020     | Sangue        | U. coronariana |
| <b>22778</b> | NFC    | 25/06/2020     | Sangue   | U. coronariana |              |        |                |               |                |

Legenda: \* = informação não identificada; FC – Pacientes com fibrose cística; NFC – Pacientes sem fibrose cística; Sec. - Secreção; Mat. - Material; D – Direito; Asp. – Aspirado; AMI - Ambulatório de medicina integral; Cir. - Cirurgia; CTI – Centro de terapia intensiva; UTI – Unidade de terapia intensiva; UI – Unidade intermediária; Enf. - Enfermaria; DIP - Doenças infecciosas e parasitárias; NESA - Núcleo de estudos da saúde do adolescente; ORL – Otorrinolaringologia; PG - Plantão geral; U. - Unidade; UCIPG – Unidade de cuidados intensivos do plantão geral; Dermato. - Dermatologia; HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto; IFF – Instituto Fernandes Figueira; PPC - Policlínica Piquet Carneiro; INT – Internado.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.2 Identificação por metodologias fenotípicas

As 103 amostras apresentaram resultados nas provas fenotípicas compatíveis com *S. marcescens*, isto é, metabolismo fermentativo, móveis, utilizaram o citrato como única fonte de carbono, e não produziram sulfeto de hidrogênio e indol. Além disso, foram capazes de fermentar os açúcares glicose e sacarose. Apresentaram atividade das enzimas DNase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase e nenhuma exibiu atividade da arginina dihidrolase. Trinta e duas amostras (31%) apresentaram atividade fraca da enzima urease.

### 3.3 Identificação por espectrometria de massa

A análise das 103 amostras feita pelo equipamento Microflex LT - Bruker Daltonics MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha) demonstrou que todas as amostras pertencem ao gênero *Serratia* spp., além de apresentar valores de *score*, possibilitando a identificação das amostras em espécies (Tabela 5).

Com base nos valores de *score* apresentados, as amostras foram classificadas a nível de gênero caso apresentasse pontuações que variassem de 1.70 a 1.99, e em espécie com pontuações iguais ou acima de 2.00. A partir dessa informação, 62 (60,1%) amostras foram caracterizadas como *S. marcescens*, 12 (11,6%) como *Serratia ureilytica*, e 29 (28,1%) foram identificadas apenas em gênero. Neste último caso, o equipamento sugeriu a identificação como *S. marcescens* e/ou *S. ureilytica* (Tabela 5).

Tabela 5 – Identificação das amostras de *Serratia* spp. de acordo com o resultado da análise por espectrometria de massa e seus respectivos valores de *score* (continua)

| Amostra       | Microrganismo<br>(1ª identificação) | Score | Microrganismo<br>(2ª identificação) | Score | Amostra       | Microrganismo<br>(1ª identificação) | Score | Microrganismo<br>(2ª identificação) | Score |
|---------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|---------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| <b>2956*</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 1.753 | Identificação não confiável         | 1.632 | <b>12993</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.026 | <i>S. marcescens</i>                | 2.001 |
| <b>3154*</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 1.802 | <i>S. marcescens</i>                | 1.743 | <b>12994</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.143 | <i>S. marcescens</i>                | 2.141 |
| <b>3581</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.338 | <i>S. marcescens</i>                | 2.242 | <b>13004*</b> | <i>S. marcescens</i>                | 1.993 | <i>S. ureilytica</i>                | 1.97  |
| <b>4190</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.081 | <i>S. marcescens</i>                | 1.89  | <b>13435</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.147 | <i>S. marcescens</i>                | 2.052 |
| <b>5798*</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 1.927 | <i>S. marcescens</i>                | 1.843 | <b>13462</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.031 | <i>S. marcescens</i>                | 2.012 |
| <b>6696 A</b> | <i>S. marcescens</i>                | 2.083 | <i>S. marcescens</i>                | 2.028 | <b>13532</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.173 | <i>S. marcescens</i>                | 2.141 |
| <b>6696 B</b> | <i>S. marcescens</i>                | 2.05  | <i>S. marcescens</i>                | 1.987 | <b>13545</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.11  | <i>S. marcescens</i>                | 2.059 |
| <b>6946*</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 1.995 | <i>S. marcescens</i>                | 1.992 | <b>13547</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.156 | <i>S. marcescens</i>                | 2.071 |
| <b>6947</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.055 | <i>S. marcescens</i>                | 1.98  | <b>13595</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.039 | <i>S. marcescens</i>                | 2.037 |
| <b>6957*</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 1.811 | <i>S. marcescens</i>                | 1.771 | <b>13648</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.17  | <i>S. marcescens</i>                | 2.105 |
| <b>7105</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.09  | <i>S. marcescens</i>                | 1.929 | <b>14508</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.026 | <i>S. marcescens</i>                | 1.977 |
| <b>7106</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.195 | <i>S. marcescens</i>                | 2.114 | <b>14519</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.083 | <i>S. marcescens</i>                | 2.045 |
| <b>7145</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.139 | <i>S. marcescens</i>                | 2.011 | <b>14870</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.207 | <i>S. marcescens</i>                | 2.117 |
| <b>7183</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.025 | <i>S. marcescens</i>                | 1.966 | <b>14928*</b> | <i>S. marcescens</i>                | 1.906 | <i>S. marcescens</i>                | 1.856 |
| <b>7192</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.018 | <i>S. marcescens</i>                | 1.982 | <b>15366</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.025 | <i>S. marcescens</i>                | 1.997 |
| <b>7456</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.013 | <i>S. marcescens</i>                | 2.013 | <b>16089</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.097 | <i>S. marcescens</i>                | 1.992 |
| <b>7771</b>   | <i>S. marcescens</i>                | 2.01  | <i>S. marcescens</i>                | 1.987 | <b>16187</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.039 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.001 |
| <b>11424</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.138 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.085 | <b>16261</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.012 | <i>S. marcescens</i>                | 1.966 |
| <b>11740</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.231 | <i>S. marcescens</i>                | 2.118 | <b>16467</b>  | <i>S. ureilytica</i>                | 2.163 | <i>S. marcescens</i>                | 2.124 |
| <b>11979</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.185 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.173 | <b>17397</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.052 | <i>S. marcescens</i>                | 1.996 |
| <b>12076*</b> | <i>S. ureilytica</i>                | 1.975 | <i>S. marcescens</i>                | 1.905 | <b>17657</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.068 | <i>S. marcescens</i>                | 1.856 |
| <b>12678*</b> | <i>S. marcescens</i>                | 1.774 | <i>S. marcescens</i>                | 1.716 | <b>17763</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.236 | <i>S. marcescens</i>                | 2.069 |
| <b>12698</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.287 | <i>S. marcescens</i>                | 2.256 | <b>17805</b>  | <i>S. ureilytica</i>                | 2.141 | <i>S. marcescens</i>                | 2.125 |
| <b>12872*</b> | <i>S. marcescens</i>                | 1.944 | <i>S. marcescens</i>                | 1.88  | <b>17852</b>  | <i>S. marcescens</i>                | 2.072 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.02  |

Tabela 5 – Identificação das amostras de *Serratia* spp. de acordo com o resultado da análise por espectrometria de massa e seus respectivos valores de *score* (continuação)

| Amostra | Microrganismo<br>(1ª identificação) | Score | Microrganismo<br>(2ª identificação) | Score | Amostra | Microrganismo<br>(1ª identificação) | Score | Microrganismo<br>(2ª identificação) | Score |
|---------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|---------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| 17908   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.177 | <i>S. marcescens</i>                | 2.106 | 22407*  | <i>S. ureilytica</i>                | 1.954 | <i>S. marcescens</i>                | 1.861 |
| 17949   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.313 | <i>S. marcescens</i>                | 2.133 | 22408*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.997 | <i>S. marcescens</i>                | 1.947 |
| 18054   | <i>S. marcescens</i>                | 2.141 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.015 | 22426   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.034 | <i>S. marcescens</i>                | 1.921 |
| 18101   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.15  | <i>S. marcescens</i>                | 2.117 | 22427   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.202 | <i>S. marcescens</i>                | 1.78  |
| 18653   | <i>S. marcescens</i>                | 2.013 | <i>S. marcescens</i>                | 1.92  | 22428*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.794 | <i>S. marcescens</i>                | 1.762 |
| 18672   | <i>S. marcescens</i>                | 2.045 | <i>S. ureilytica</i>                | 1.96  | 22437   | <i>S. marcescens</i>                | 2.119 | <i>S. marcescens</i>                | 2.018 |
| 18752   | <i>S. marcescens</i>                | 2.04  | <i>S. marcescens</i>                | 1.933 | 22438*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.796 | <i>S. marcescens</i>                | 1.742 |
| 19382   | <i>S. marcescens</i>                | 2.092 | <i>S. marcescens</i>                | 2.089 | 22450*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.783 | Identificação<br>não confiável      | 1.615 |
| 19793 A | <i>S. marcescens</i>                | 2.295 | <i>S. marcescens</i>                | 2.12  | 22454*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.825 | <i>S. marcescens</i>                | 1.704 |
| 19793 B | <i>S. marcescens</i>                | 2.245 | <i>S. marcescens</i>                | 2.196 | 22461*  | <i>S. ureilytica</i>                | 1.737 | <i>S. marcescens</i>                | 1.718 |
| 20195   | <i>S. marcescens</i>                | 2.2   | <i>S. marcescens</i>                | 2.024 | 22466   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.152 | <i>S. marcescens</i>                | 2.046 |
| 21186*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.909 | <i>S. marcescens</i>                | 1.827 | 22470   | <i>S. marcescens</i>                | 2.148 | <i>S. marcescens</i>                | 1.883 |
| 21795   | <i>S. marcescens</i>                | 2.039 | <i>S. marcescens</i>                | 1.947 | 22472   | <i>S. marcescens</i>                | 2.225 | <i>S. marcescens</i>                | 2.089 |
| 21796   | <i>S. marcescens</i>                | 2.096 | <i>S. marcescens</i>                | 2.059 | 22473   | <i>S. marcescens</i>                | 2.068 | <i>S. marcescens</i>                | 2.037 |
| 21856   | <i>S. marcescens</i>                | 2.019 | <i>S. marcescens</i>                | 1.994 | 22474   | <i>S. marcescens</i>                | 2.091 | <i>S. marcescens</i>                | 2.009 |
| 21901*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.747 | Identificação<br>não confiável      | 1.633 | 22501   | <i>S. marcescens</i>                | 2.088 | <i>S. marcescens</i>                | 2.001 |
| 21921   | <i>S. marcescens</i>                | 2.129 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.116 | 22521   | <i>S. marcescens</i>                | 2.24  | <i>S. marcescens</i>                | 2.214 |
| 22173   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.262 | <i>S. marcescens</i>                | 2.144 | 22522   | <i>S. marcescens</i>                | 2.046 | <i>S. marcescens</i>                | 2.023 |
| 22184   | <i>S. ureilytica</i>                | 2.319 | <i>S. marcescens</i>                | 2.21  | 22531*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.992 | <i>S. marcescens</i>                | 1.915 |
| 22283*  | <i>S. ureilytica</i>                | 1.927 | <i>S. marcescens</i>                | 1.835 | 22556*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.776 | <i>S. marcescens</i>                | 1.734 |
| 22356   | <i>S. marcescens</i>                | 2.007 | <i>S. marcescens</i>                | 1.968 | 22594   | <i>S. marcescens</i>                | 2.216 | <i>S. ureilytica</i>                | 2.182 |
| 22357*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.916 | <i>S. ureilytica</i>                | 1.84  | 22623*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.911 | <i>S. marcescens</i>                | 1.871 |
| 22358*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.952 | <i>S. ureilytica</i>                | 1.905 | 22779*  | <i>S. marcescens</i>                | 1.996 | <i>S. marcescens</i>                | 1.964 |
| 22401   | <i>S. marcescens</i>                | 2.159 | <i>S. marcescens</i>                | 2.083 | 22777   | <i>S. marcescens</i>                | 2.075 | <i>S. marcescens</i>                | 1.976 |

Tabela 5 – Identificação das amostras de *Serratia* spp. de acordo com o resultado da análise por espectrometria de massa e seus respectivos valores de *score* (conclusão)

| <b>Amostra</b> | <b>Microrganismo<br/>(1ª identificação)</b> | <b>Score</b> | <b>Microrganismo<br/>(2ª identificação)</b> | <b>Score</b> | <b>Amostra</b> | <b>Microrganismo<br/>(1ª identificação)</b> | <b>Score</b> | <b>Microrganismo<br/>(2ª identificação)</b> | <b>Score</b> |
|----------------|---------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|--------------|----------------|---------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|--------------|
| <b>22778*</b>  | <i>S. marcescens</i>                        | 1.921        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.836        | <b>22782*</b>  | <i>S. marcescens</i>                        | 1.989        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.937        |
| <b>22780</b>   | <i>S. ureilytica</i>                        | 2.128        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.999        | <b>22783*</b>  | <i>S. ureilytica</i>                        | 1.925        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.773        |
| <b>22781</b>   | <i>S. ureilytica</i>                        | 2.101        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.985        | <b>22784*</b>  | <i>S. marcescens</i>                        | 1.971        | <i>S. marcescens</i>                        | 1.918        |

Legenda: \* - amostras identificadas apenas a nível de gênero.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.4 Detecção de biomarcadores

Os espectros gerados pela análise do MALDI TOF foram inseridos no programa *Bionumerics* v.7.6.2 (Applied Maths<sup>®</sup>, Sint-Martens-Laten, Bélgica) e analisados quanto à correlação da similaridade, a fim de identificar peptídeos biomarcadores espécie específicos. Para realizar tal processo, foi executada a função de correspondência de picos.

Para a análise dos biomarcadores da espécie *S. marcescens*, foram utilizadas as amostras (n=62) que exibiram *score*  $\geq 2.00$ . Ao realizar a correspondência de picos, o programa forneceu 24 picos dentro da faixa de 2691.22 m/z até 10321.26 m/z (Tabela 6).

Em seguida, foram selecionadas apenas as amostras (n=12) identificadas como *S. ureilytica* com *score*  $\geq 2.00$ . Ao gerar a correspondência de picos, foi possível constatar a presença de 48 picos dentro da faixa de 3115.76 m/z a 12619.33 m/z (Tabela 6).

Portanto, nesse estudo foram considerados biomarcadores espécie específicos aqueles presentes em pelo menos 70% das amostras analisadas, visto que todos os picos presentes acima desse percentual em uma espécie, estavam ausentes na outra espécie.

Foi analisado também a intensidade dos picos espécie específicos (Tabela 7). Para avaliar esse item, foi calculado a média da intensidade de cada biomarcador, e a partir disso, os picos que apresentaram intensidade abaixo da média foram lidos como ausentes naquela amostra.

É possível observar que os percentuais estão abaixo de 70% de presença, valor anteriormente tido como referência para a determinação de picos biomarcadores. Para a espécie *S. marcescens*, os percentuais variam de 32,7% a 45,9%, e para *S. ureilytica*, estão na faixa de 25% a 66,6%. Mesmo aqueles que estavam presentes em 100% das amostras em determinada espécie, apresentaram baixa intensidade (Tabela 7).

Tabela 6 – Percentual de presença de biomarcadores espécie específicos em amostras de *Serratia* spp (continua)

| Relação m/z | <i>S. marcescens</i><br>(n= 62)<br>(%) | <i>S. ureilytica</i><br>(n= 12)<br>(%) |
|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 2691.22     | 96,7                                   | 0                                      |
| 2827.03     | 86,8                                   | 0                                      |
| 3060.18     | 85,2                                   | 0                                      |
| 3115.76     | 0                                      | 100                                    |
| 3115.83     | 96,7                                   | 0                                      |
| 3607.78     | 78,6                                   | 0                                      |
| 3607.90     | 0                                      | 83,3                                   |
| 3639.21     | 0                                      | 100                                    |
| 3842.57     | 0                                      | 75                                     |
| 3916.63     | 83,6                                   | 0                                      |
| 3916.82     | 0                                      | 91,6                                   |
| 3965.28     | 77                                     | 0                                      |
| 3965.51     | 0                                      | 91,6                                   |
| 4125.07     | 0                                      | 75                                     |
| 4188.38     | 0                                      | 100                                    |
| 4188.62     | 77                                     | 0                                      |
| 4354.12     | 88,5                                   | 0                                      |
| 4354.13     | 0                                      | 91,6                                   |
| 4436.21     | 0                                      | 75                                     |
| 4609.84     | 0                                      | 91,6                                   |
| 4772.56     | 0                                      | 100                                    |
| 4772.65     | 96,7                                   | 0                                      |
| 4785.60     | 0                                      | 100                                    |
| 4863.04     | 70,4                                   | 0                                      |
| 4998.34     | 0                                      | 83,3                                   |
| 5161.86     | 0                                      | 100                                    |
| 5386.12     | 100                                    | 0                                      |
| 5386.32     | 0                                      | 91,6                                   |
| 5643.96     | 0                                      | 75                                     |
| 5709.41     | 0                                      | 75                                     |
| 6121.76     | 0                                      | 91,6                                   |
| 6121.86     | 96,7                                   | 0                                      |
| 6232.93     | 100                                    | 0                                      |
| 6233.11     | 0                                      | 83,3                                   |
| 6310.64     | 0                                      | 75                                     |
| 6375.82     | 0                                      | 75                                     |
| 6449.11     | 83,6                                   | 0                                      |
| 6449.13     | 0                                      | 83,3                                   |
| 6551.61     | 0                                      | 91,6                                   |
| 7215.51     | 0                                      | 100                                    |

Tabela 6 – Percentual de presença de biomarcadores espécie específicos em amostras de *Serratia* spp (conclusão)

| Relação m/z | <i>S. marcescens</i><br>(n= 62)<br>(%) | <i>S. ureilytica</i><br>(n= 12)<br>(%) |
|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 7215.62     | 100                                    | 0                                      |
| 7278.24     | 0                                      | 100                                    |
| 7278.53     | 100                                    | 0                                      |
| 7524.87     | 0                                      | 91,6                                   |
| 7832.51     | 93,4                                   | 0                                      |
| 7832.96     | 0                                      | 83,3                                   |
| 7930.23     | 0                                      | 100                                    |
| 7930.39     | 86,8                                   | 0                                      |
| 8248.91     | 0                                      | 91,6                                   |
| 8375.77     | 0                                      | 100                                    |
| 8375.99     | 88,5                                   | 0                                      |
| 8416.11     | 0                                      | 83,3                                   |
| 8870.18     | 0                                      | 75                                     |
| 8904.77     | 0                                      | 75                                     |
| 8987.07     | 0                                      | 83,3                                   |
| 9071.18     | 0                                      | 83,3                                   |
| 9112.26     | 0                                      | 75                                     |
| 9218.41     | 93,4                                   | 0                                      |
| 9218.69     | 0                                      | 83,3                                   |
| 9542.97     | 98,3                                   | 0                                      |
| 9543.26     | 0                                      | 91,6                                   |
| 9568.37     | 73,7                                   | 0                                      |
| 9568.45     | 0                                      | 91,6                                   |
| 9993.82     | 0                                      | 83,3                                   |
| 10321.26    | 88,5                                   | 0                                      |
| 10322.22    | 0                                      | 83,3                                   |
| 10555.62    | 0                                      | 75                                     |
| 10664.03    | 0                                      | 91,6                                   |
| 11005.66    | 0                                      | 83,3                                   |
| 11285.05    | 0                                      | 75                                     |
| 11415.72    | 0                                      | 75                                     |
| 12619.33    | 0                                      | 83,3                                   |

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 7 – Percentual de intensidade dos picos biomarcadores encontrados em cada espécie (continua)

| Relação m/z | <i>S. marcescens</i><br>(n= 62)<br>(%) | <i>S. ureilytica</i><br>(n= 12)<br>(%) |
|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 2691.22     | 39,3                                   | 0                                      |
| 2827.03     | 37,7                                   | 0                                      |
| 3060.18     | 45,9                                   | 0                                      |
| 3115.76     | 0                                      | 41,6                                   |
| 3115.83     | 36                                     | 0                                      |
| 3607.78     | 34,4                                   | 0                                      |
| 3607.90     | 0                                      | 58,3                                   |
| 3639.21     | 0                                      | 50                                     |
| 3842.57     | 0                                      | 50                                     |
| 3916.63     | 37,7                                   | 0                                      |
| 3916.82     | 0                                      | 50                                     |
| 3965.28     | 32,7                                   | 0                                      |
| 3965.51     | 0                                      | 41,6                                   |
| 4125.07     | 0                                      | 25                                     |
| 4188.38     | 0                                      | 50                                     |
| 4188.62     | 36                                     | 0                                      |
| 4354.12     | 34,4                                   | 0                                      |
| 4354.13     | 0                                      | 33,3                                   |
| 4436.21     | 0                                      | 58,3                                   |
| 4609.84     | 0                                      | 50                                     |
| 4772.56     | 0                                      | 50                                     |
| 4772.65     | 34,4                                   | 0                                      |
| 4785.60     | 0                                      | 58,3                                   |
| 4863.04     | 44,2                                   | 0                                      |
| 4998.34     | 0                                      | 50                                     |
| 5161.86     | 0                                      | 66,6                                   |
| 5386.12     | 42,6                                   | 0                                      |
| 5386.32     | 0                                      | 41,6                                   |
| 5643.96     | 0                                      | 50                                     |
| 5709.41     | 0                                      | 58,3                                   |
| 6121.76     | 0                                      | 41,6                                   |
| 6121.86     | 39,3                                   | 0                                      |
| 6232.93     | 39,3                                   | 0                                      |
| 6233.11     | 0                                      | 41,6                                   |
| 6310.64     | 0                                      | 41,6                                   |
| 6375.82     | 0                                      | 58,3                                   |
| 6449.11     | 39,3                                   | 0                                      |
| 6449.13     | 0                                      | 66,6                                   |
| 6551.61     | 0                                      | 50                                     |
| 7215.51     | 0                                      | 58,3                                   |

Tabela 7 – Percentual de intensidade dos picos biomarcadores encontrados em cada espécie (conclusão)

| Relação m/z | <i>S. marcescens</i><br>(n= 62)<br>(%) | <i>S. ureilytica</i><br>(n= 12)<br>(%) |
|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 7215.62     | 42,6                                   | 0                                      |
| 7278.24     | 0                                      | 50                                     |
| 7278.53     | 36                                     | 0                                      |
| 7524.87     | 0                                      | 41,6                                   |
| 7832.51     | 42,6                                   | 0                                      |
| 7832.96     | 0                                      | 58,3                                   |
| 7930.23     | 0                                      | 50                                     |
| 7930.39     | 37,7                                   | 0                                      |
| 8248.91     | 0                                      | 25                                     |
| 8375.77     | 0                                      | 50                                     |
| 8375.99     | 37,7                                   | 0                                      |
| 8416.11     | 0                                      | 33,3                                   |
| 8870.18     | 0                                      | 66,6                                   |
| 8904.77     | 0                                      | 41,6                                   |
| 8987.07     | 0                                      | 66,6                                   |
| 9071.18     | 0                                      | 50                                     |
| 9112.26     | 0                                      | 33,3                                   |
| 9218.41     | 37,7                                   | 0                                      |
| 9218.69     | 0                                      | 50                                     |
| 9542.97     | 40,9                                   | 0                                      |
| 9543.26     | 0                                      | 50                                     |
| 9568.37     | 45,9                                   | 0                                      |
| 9568.45     | 0                                      | 50                                     |
| 9993.82     | 0                                      | 41,6                                   |
| 10321.26    | 32,7                                   | 0                                      |
| 10322.22    | 0                                      | 58,3                                   |
| 10555.62    | 0                                      | 41,6                                   |
| 10664.03    | 0                                      | 41,6                                   |
| 11005.66    | 0                                      | 41,6                                   |
| 11285.05    | 0                                      | 50                                     |
| 11415.72    | 0                                      | 58,3                                   |
| 12619.33    | 0                                      | 50                                     |

Fonte: A autora, 2022.

Os picos foram exportados para o programa *Excel* (Microsoft®, EUA) no formato de tabela binária de presença e ausência. A variação dos percentuais de presença dos picos exibidos na tabela 6 estão representados de forma colorimétrica na figura 1, com o intuito de simplificar a análise visual. A cor azul representa a presença do biomarcador em 100% das amostras; verde: representa a presença em 90-99% das amostras; amarelo: representa a presença em 70-89% das amostras e vermelho a ausência do biomarcador.

É possível observar na figura 1 que os picos coloridos de vermelho para *S. marcescens* (ausentes em 100% das amostras), estão presentes em percentuais que variam de 75% a 100% nas amostras de *S. ureilytica*. Além disso, os picos coloridos em vermelho para *S. ureilytica*, podem ser observados em *S. marcescens* com variações de percentual (70,4% a 100%). As duas espécies não exibiram picos em comum.

Os picos 3115.76 m/z, 3639.21 m/z, 4188.38 m/z, 4772.56 m/z, 4785.60 m/z, 5161.86 m/z, 7215.51 m/z, 7278.24 m/z, 7930.23 m/z e 8377 m/z aparecem em 100% das amostras de *S. ureilytica*. Já os picos 5386.12 m/z, 6232.93 m/z, 7215.62 e 7278.53 m/z estão presentes em 100% das amostras de *S. marcescens*.

Figura 1 - Classificação colorimétrica do percentual de variação de presença dos picos biomarcadores em amostras de *Serratia marcescens* e *Serratia ureilytica* (continua)

[illegible]

Figura 1 - Classificação colorimétrica do percentual de variação de presença dos picos biomarcadores em amostras de *Serratia marcescens* e *Serratia ureilytica* (conclusão)

| MALDI TOF | BIOMARCADORES |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|           | 6             | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |

Legenda: Azul: representa a presença do biomarcador em 100% das amostras; Verde: representa a presença em 90-99% das amostras; Amarelo: representa a presença em 70-89% das amostras.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.5 Identificação pelo sistema VITEK® 2

Para realizar essa análise, foram utilizadas apenas as amostras identificadas como *S. ureilytica* com *score* acima de 2.00 pela espectrometria de massa, com o intuito de realizar uma comparação entre os resultados obtidos nos testes de identificação. De acordo com o resultado obtido pela análise do sistema VITEK® 2, todas as 12 amostras avaliadas foram identificadas como *S. marcescens* com um percentual de confiança  $\geq 95\%$ . Em relação a identificação, os resultados foram iguais aos apresentados pelo teste fenotípico manual e distintos da identificação obtida por espectrometria de massa.

### 3.6 Comparação entre os resultados obtidos nos testes fenotípicos

As amostras identificadas como *S. ureilytica* por espectrometria de massa com *score* acima de 2.00 na primeira leitura foram identificadas como *S. marcescens* com alto percentual de confiança pelo sistema VITEK® 2. Ao avaliar separadamente as provas bioquímicas do equipamento, foi observado que nenhuma amostra apresentou atividade da enzima urease, característica de *S. ureilytica*. Enquanto sete das 12 amostras apresentaram um resultado positivo fraco para esta enzima por meio das provas manuais. Além disso, ao analisar os resultados da atividade da enzima arginina dihidrolase, foi observado resultado negativo para todas as amostras, diferente do que era esperado para caracterizar essa espécie.

A partir dos resultados das análises fenotípicas, não foi observada concordância entre as identificações apresentadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação entre os resultados obtidos a partir da identificação por espectrometria de massa, pelo sistema VITEK® 2 e por provas bioquímicas, utilizando as amostras caracterizadas como *S. ureilytica* pelo MALDI TOF

| Amostra | 1º Identificação<br>MALDI-TOF | Score | 2º Identificação<br>MALDI-TOF | Score | Identificação<br>VITEK® 2 | Percentual de<br>confiança | Urease<br>VITEK® 2 | Urease<br>Bioquímica<br>(manual) | Arginina<br>dihidrolase<br>Bioquímica<br>(manual) |
|---------|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|---------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| 16467   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.163 | <i>S. marcescens</i>          | 2.124 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Negativa                         | Negativa                                          |
| 17805   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.141 | <i>S. marcescens</i>          | 2.125 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 17908   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.177 | <i>S. marcescens</i>          | 2.106 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 17949   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.313 | <i>S. marcescens</i>          | 2.133 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 18101   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.15  | <i>S. marcescens</i>          | 2.117 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 22173   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.262 | <i>S. marcescens</i>          | 2.144 | <i>S. marcescens</i>      | 95%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 22184   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.319 | <i>S. marcescens</i>          | 2.21  | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 22426   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.034 | <i>S. marcescens</i>          | 1.921 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Positiva (fraca)                 | Negativa                                          |
| 22427   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.202 | <i>S. marcescens</i>          | 1.78  | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Negativa                         | Negativa                                          |
| 22466   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.152 | <i>S. marcescens</i>          | 2.046 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Negativa                         | Negativa                                          |
| 22780   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.128 | <i>S. marcescens</i>          | 1.999 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Negativa                         | Negativa                                          |
| 22781   | <i>S. ureilytica</i>          | 2.101 | <i>S. marcescens</i>          | 1.985 | <i>S. marcescens</i>      | 99%                        | Negativa           | Negativa                         | Negativa                                          |

Fonte: A autora, 2022.

### 3.7 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os resultados encontrados no teste de disco-difusão mostraram que pouco mais de um terço das amostras de *Serratia* spp. apresentaram resistência a algum antimicrobiano testado. Os maiores percentuais de resistência foram para os antimicrobianos aztreonam (n=36; 34,9%) e sulfametoxazol-trimetoprim (n=27; 26,2%). Em relação aos carbapenêmicos, os percentuais de amostras resistentes chegaram a 15,5% (n=16), com destaque para o ertapenem, em seguida o imipenem (n=6; 5,8%) e meropenem (n=2; 1,9%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Taxas de resistência aos antimicrobianos determinadas pelo método de disco-difusão em amostras de *Serratia* spp.

| Antimicrobianos                   | Total     |           |           |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                   | n= 103    |           |           |
|                                   | S (%)     | I (%)     | R (%)     |
| <b>Meropenem</b>                  | 96 (93,2) | 5 (4,8)   | 2 (1,9)   |
| <b>Imipenem</b>                   | 89 (86,4) | 8 (7,7)   | 6 (5,8)   |
| <b>Ertapenem</b>                  | 87 (84,4) | 0 (0)     | 16 (15,5) |
| <b>Amicacina</b>                  | 79 (76,6) | 2 (1,9)   | 22 (21,3) |
| <b>Gentamicina</b>                | 83 (80,5) | 1 (0,9)   | 19 (18,4) |
| <b>Ciprofloxacina</b>             | 60 (58,2) | 25 (24,2) | 18 (17,4) |
| <b>Aztreonam</b>                  | 65 (63,1) | 2 (1,9)   | 36 (34,9) |
| <b>Sulfametoxazol-Trimetoprim</b> | 76 (73,7) | 0 (0)     | 27 (26,2) |

Legenda: S - sensível; I - sensível aumentando exposição; R - resistente.  
Fonte: A autora, 2022.

Analisando o perfil de resistência, foi possível classificar 28 (27,1%) amostras como multirresistentes (MDR). Entre as amostras classificadas como MDR, 8 (28,5%) amostras exibiram resistência a pelo menos um carbapenêmico, 23 (82,1%) amostras apresentaram resistência a pelo menos um aminoglicosídeo, 26 (92,8%) amostras demonstraram resistência ao aztreonam, 20 (71,4%) amostras exibiram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, e 14 (50%) amostras apresentaram resistência ao ciprofloxacino (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição das amostras conforme o perfil de resistência elaborado a partir dos resultados obtidos por disco-difusão

| <b>Perfil de resistência</b>  | <b>Perfil</b> | <b>nº de amostras</b> |
|-------------------------------|---------------|-----------------------|
| <b>MER-IPM-ERT-AK-CIP-AZT</b> | 1             | 1                     |
| <b>IPM-ERT-AK-CIP-AZT</b>     | 2             | 1                     |
| <b>AK-CN-CIP-AZT-SXT</b>      | 3             | 4                     |
| <b>MER-IPM-ERT-CIP</b>        | 4             | 1                     |
| <b>ERT-CIP-AZT-SXT</b>        | 5             | 1                     |
| <b>IPM-ERT-AK-AZT</b>         | 6             | 1                     |
| <b>AK-CN-AZT-SXT</b>          | 7             | 6                     |
| <b>AK-CN-CIP-AZT</b>          | 8             | 1                     |
| <b>IPM-ERT-AZT</b>            | 9             | 2                     |
| <b>ERT-CIP-AZT</b>            | 10            | 3                     |
| <b>CIP-AZT-SXT</b>            | 11            | 1                     |
| <b>AK-AZT-SXT</b>             | 12            | 3                     |
| <b>CN-AZT-SXT</b>             | 13            | 4                     |
| <b>ERT-AK-CIP</b>             | 14            | 1                     |
| <b>CN-CIP-SXT</b>             | 15            | 1                     |
| <b>AK-CN-AZT</b>              | 16            | 1                     |
| <b>AK-CN-SXT</b>              | 17            | 1                     |
| <b>AZT-SXT</b>                | 18            | 3                     |
| <b>ERT-AZT</b>                | 19            | 4                     |
| <b>AK-SXT</b>                 | 20            | 1                     |
| <b>CN-SXT</b>                 | 21            | 1                     |
| <b>ERT-AK</b>                 | 22            | 1                     |
| <b>SXT</b>                    | 23            | 1                     |
| <b>CIP</b>                    | 24            | 3                     |

Legenda: MER – Meropenem; IPM – Imipenem; ERT – Ertapenem; AK – Amicacina; CN – Gentamicina; AZT – Aztreonam; CIP – Ciprofloxacina; SXT – Sulfametoxazol-trimetoprim.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.8 Correlação dos perfis de resistência aos antimicrobianos e os biomarcadores obtidos por espectrometria de massa

Foram analisados visualmente os perfis de presença e ausência dos biomarcadores de acordo com a tabela binária visualizada no *Excel* (Microsoft®, EUA). A partir dessa observação, foi elaborada uma tabela agrupando as amostras que apresentaram perfis idênticos de picos biomarcadores e sua correlação com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, a fim de encontrar uma relação entre as amostras alocadas no mesmo perfil. Baseado nisso, foi constatada a presença de 10 perfis correspondentes de biomarcadores, estes foram classificados de acordo com as letras do alfabeto (Tabela 11).

Os perfis F e J apresentaram caráter multissensível, enquanto os outros perfis exibiram variações em relação ao resultado apresentado no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. As amostras 17949 e 22781 oriundas de secreção/aspirado traqueal pertencem ao perfil A, a amostra 17949 exibiu resistência a ciprofloxacino, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim, e se mostrou sensível aos aminoglicosídeos e aos carbapenêmicos, já a amostra 22781 apresentou sensibilidade à gentamicina, ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprim, sensibilidade aumentando exposição a meropenem, e resistência aos carbapenêmicos imipenem e ertapenem, ampicilina e aztreonam.

O perfil B é composto por duas amostras provenientes de sangue (3581 e 22521). A amostra 3581 apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos e gentamicina, sensibilidade aumentando exposição ao ciprofloxacino e aztreonam, e resistência ao aminoglicosídeo ampicilina e ao sulfametoxazol-trimetoprim. A amostra 22521 exibiu sensibilidade aumentando exposição ao carbapenêmico imipenem e sensibilidade aos outros antimicrobianos testados.

As amostras 7771 e 11740 oriundas de sangue formam o perfil C. Apresentaram em comum a sensibilidade aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos, além da resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim. Enquanto a amostra 11740 apresentou resistência à gentamicina e ao aztreonam, a amostra 7771 se mostrou sensível. Além disso, 7771 possui caráter sensível aumentando exposição a ciprofloxacino, enquanto 11740 é suscetível.

O perfil D é composto por 13 amostras, dentre estas, as amostras 13547, 13532, 12994, 12993, 13545, 15366 e 7183 apresentaram um perfil de suscetibilidade similar. Exibiram sensibilidade aos carbapenêmicos, sensibilidade aumentando exposição ao

ciprofloxacino e resistência aos aminoglicosídeos, ao aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim. Com exceção das amostras 12994, 15366 e 7183 que apresentaram sensibilidade a um ou dois dos aminoglicosídeos testados, além da amostra 7183 que exibiu caráter sensível aumentando exposição a ciprofloxacino. Já as amostras 7106 e 14508 são suscetíveis aos carbapenêmicos e resistente aos demais antimicrobianos. A amostra 14870 exibiu caráter multissensível, já as amostras 20195 e 19382 eram suscetíveis aumentando exposição a um dos aminoglicosídeos testados. Além disso, a amostra 17397 apresentou resistência aos betalactâmicos testados, com exceção do meropenem, e exibiu sensibilidade aos demais.

O perfil E é constituído pelas amostras 7105 e 18752, provenientes de sangue e secreção traqueal, respectivamente. A amostra 18752 é suscetível a todos os antimicrobianos, exceto o ciprofloxacino, diferente da amostra 7105, que possui sensibilidade apenas aos carbapenêmicos.

As amostras 18672 e 21921, oriundas de secreção traqueal e sangue respectivamente, compõem o perfil G. Apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos, com exceção do ertapenem, suscetibilidade aos aminoglicosídeos e ao sulfametoxazol-trimetoprim, resistência ao aztreonam, porém a amostra 18672 é resistente a ciprofloxacino e a 21921 é sensível aumentando exposição.

O perfil H é composto por três amostras (18054, 17763 e 17657) procedentes de sangue. As amostras 17763 e 17657 apresentaram um perfil multissensível, diferente da amostra 18054, que é resistente a aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim, além de ser suscetível aumentando exposição ao ciprofloxacino.

Duas amostras (16261 e 16187) oriundas de sangue integram o perfil I. Em comum, elas apresentaram sensibilidade aos aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprim e meropenem, além da resistência ao ertapenem e aztreonam. A amostra 16261 é resistente ao ciprofloxacino e sensível aumentando exposição ao imipenem. Já a amostra 16187 é sensível ao imipenem e suscetível aumentando exposição ao ciprofloxacino.

A partir da análise das amostras que apresentaram perfis de biomarcadores similares, foi possível observar tanto perfis de suscetibilidade idênticos quanto diferentes. Sendo assim, não foi identificada uma associação direta entre perfis semelhantes em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 11 – Perfis de similaridade baseados na tabela binária de biomarcadores (continua)

| Perfil | Amostras/Espécie     | Data       | Material          | MER | IPM | ERT | AK | CN | CIP | AZT | SXT |
|--------|----------------------|------------|-------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| A      | 17949 <sup>S.u</sup> | 20/05/2014 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | S  | S  | R   | R   | R   |
| A      | 22781 <sup>S.u</sup> | 21/10/2020 | Aspirado traqueal | I   | R   | R   | R  | S  | S   | R   | S   |
| B      | 3581 <sup>S.m</sup>  | 13/09/2003 | Sangue            | S   | S   | S   | R  | S  | I   | I   | R   |
| B      | 22521 <sup>S.m</sup> | 13/11/2019 | Sangue            | S   | I   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| C      | 7771 <sup>S.m</sup>  | 07/07/2008 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | I   | S   | R   |
| C      | 11740 <sup>S.m</sup> | 08/02/2011 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | R  | S   | R   | R   |
| D      | 7183 <sup>S.m</sup>  | *          | Sangue            | S   | S   | S   | R  | S  | I   | R   | R   |
| D      | 7106 <sup>S.m</sup>  | 22/02/2008 | Sangue            | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |
| D      | 20195 <sup>S.m</sup> | 20/10/2015 | Escarro           | S   | S   | S   | I  | S  | S   | S   | S   |
| D      | 19382 <sup>S.m</sup> | 30/03/2015 | Escarro           | S   | S   | S   | S  | I  | S   | S   | S   |
| D      | 17397 <sup>S.m</sup> | 21/01/2014 | Secreção traqueal | I   | R   | R   | S  | S  | S   | R   | S   |
| D      | 15366 <sup>S.m</sup> | 09/10/2012 | Urina             | S   | S   | S   | S  | S  | I   | R   | R   |
| D      | 14870 <sup>S.m</sup> | 05/08/2012 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| D      | 14508 <sup>S.m</sup> | 08/05/2012 | Sangue            | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |
| D      | 13547 <sup>S.m</sup> | 23/06/2011 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| D      | 13532 <sup>S.m</sup> | 20/06/2011 | Sangue            | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| D      | 12994 <sup>S.m</sup> | 09/06/2011 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | S  | R  | I   | R   | R   |
| D      | 12993 <sup>S.m</sup> | 09/06/2011 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| D      | 13545 <sup>S.m</sup> | 23/06/2011 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |

Tabela 11 – Perfis de similaridade baseados na tabela binária de biomarcadores (conclusão)

| Perfil | Amostras/Espécie     | Data       | Material          | MER | IPM | ERT | AK | CN | CIP | AZT | SXT |
|--------|----------------------|------------|-------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| E      | 7105 <sup>S.m</sup>  | 21/02/2008 | Sangue            | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |
| E      | 18752 <sup>S.m</sup> | 02/12/2014 | Secreção traqueal | S   | S   | S   | S  | S  | R   | S   | S   |
| F      | 6947 <sup>S.m</sup>  | 02/01/2008 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| F      | 21796 <sup>S.m</sup> | 14/08/2018 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| F      | 21795 <sup>S.m</sup> | 14/08/2018 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| G      | 18672 <sup>S.m</sup> | 11/11/2014 | Secreção traqueal | S   | S   | R   | S  | S  | R   | R   | S   |
| G      | 21921 <sup>S.m</sup> | 01/10/2018 | Sangue            | S   | S   | R   | S  | S  | I   | R   | S   |
| H      | 18054 <sup>S.m</sup> | 03/08/2014 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | I   | R   | R   |
| H      | 17763 <sup>S.m</sup> | 03/04/2014 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| H      | 17657 <sup>S.m</sup> | 21/03/2014 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| I      | 16261 <sup>S.m</sup> | 19/03/2013 | Sangue            | S   | I   | R   | S  | S  | R   | R   | S   |
| I      | 16187 <sup>S.m</sup> | 19/03/2013 | Sangue            | S   | S   | R   | S  | S  | I   | R   | S   |
| J      | 22594 <sup>S.m</sup> | 23/01/2020 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| J      | 22473 <sup>S.m</sup> | 01/10/2019 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| J      | 22470 <sup>S.m</sup> | 11/10/2019 | Escarro           | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| J      | 22401 <sup>S.m</sup> | 12/09/2019 | Sangue            | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |

Legenda: S.m = *Serratia marcescens*; S.u = *Serratia ureilytica*; S= sensível; I = sensível aumentando a exposição; R = resistente; MER = meropenem; IPM = imipenem; ERT = ertapenem; AK = amicacina; CN = gentamicina; CIP = ciprofloxacina; AZT = aztreonam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; \* = informação não identificada.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.9 Pesquisa de genes codificadores de carbapenemases

A pesquisa de genes codificadores de carbapenemases por PCR nas 103 amostras de *Serratia* spp. revelou em apenas 3 (2,9%) o gene *bla<sub>KPC</sub>*. Duas amostras isoladas de sangue (22531, 22783) e uma (22781) de aspirado traqueal. Apenas a amostra 22780 oriunda de sangue exibiu o gene *bla<sub>NDM</sub>*. Nenhuma amostra exibiu os genes codificadores *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* (Tabela 12).

O resultado obtido pelo PCR foi comparado com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). De acordo com os dados exibidos na tabela 12, a amostra 22780 identificada como *S. ureilytica* pela espectrometria de massa, apresentou resistência aos três carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) e ao ciprofloxacino, sendo sensível aos demais antimicrobianos testados.

As amostras 22531 e 22783 foram identificadas apenas a nível de gênero como *Serratia* spp., e a amostra 22781 foi identificada como *S. ureilytica*. O resultado do TSA das amostras 22531, 22781 e 22783 foram semelhantes, as duas primeiras amostras exibiram resistência a imipenem e ertapenem, em relação ao meropenem, foram classificadas como sensível aumentando exposição. Já a amostra 22783 foi considerada resistente aos três carbapenêmicos. As três amostras apresentaram resistência ao aztreonam e a pelo menos um aminoglicosídeo. Além disso, apenas a amostra 22781 exibiu sensibilidade ao ciprofloxacino. Todas mostraram sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim.

Com base nessas informações, foi possível correlacionar os resultados obtidos. A resistência aos carbapenêmicos acompanhada de sensibilidade ao aztreonam sugere a presença de uma metalo-betalactamase, como foi observada na amostra 22780. Já a resistência aos carbapenêmicos em conjunto com a resistência ao aztreonam, ou seja, resistente a todos os betalactâmicos testados, indica a presença de uma serino-carbapenemase, como foi descrita nas amostras 22531, 22781 e 22783 (Tabela 12).

Tabela 12 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras que exibiram genes codificadores de carbapenemase

| Amostra | Genes                    | Espécie<br>(MALDI TOF) | Data       | Material             | Clínica        | MER | IPM | ERT | AK | CN | CIP | AZT | SXT |
|---------|--------------------------|------------------------|------------|----------------------|----------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| 22780   | <i>bla<sub>NDM</sub></i> | <i>S. ureilytica</i>   | 27/07/2020 | Sangue               | U. Coronariana | R   | R   | R   | S  | S  | R   | S   | S   |
| 22531   | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>Serratia</i> spp.   | 22/11/2019 | Sangue               | UI Cirúrgica   | I   | R   | R   | R  | S  | R   | R   | S   |
| 22783   | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>Serratia</i> spp.   | 12/11/2020 | Sangue               | U. Coronariana | R   | R   | R   | R  | S  | R   | R   | S   |
| 22781   | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>S. ureilytica</i>   | 21/10/2020 | Aspirado<br>traqueal | UTI Covid 2    | I   | R   | R   | R  | S  | S   | R   | S   |

Legenda: S= sensível; I = sensível aumentando a exposição; R = resistente; MER = meropenem; IPM = imipenem; ERT = ertapenem; AK = ampicilina; CN = gentamicina; CIP = ciprofloxacina; AZT = aztreonam; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim.

Fonte: A autora, 2022.

### 3.10 Agrupamentos baseado nos espectros de massa obtidos entre *Serratia* spp.

Para analisar o dendrograma representado na figura 2, foi utilizado como ponto de corte o percentual de 85% de similaridade entre as amostras. Com base nisso, foi realizado um agrupamento das amostras que compartilharam o mesmo cluster, sendo assim, amostras similares pertencem ao mesmo perfil.

Figura 2 – Dendrograma representando o percentual de proximidade entre as amostras de *Serratia marcescens* e *Serratia ureilytica* (continua)

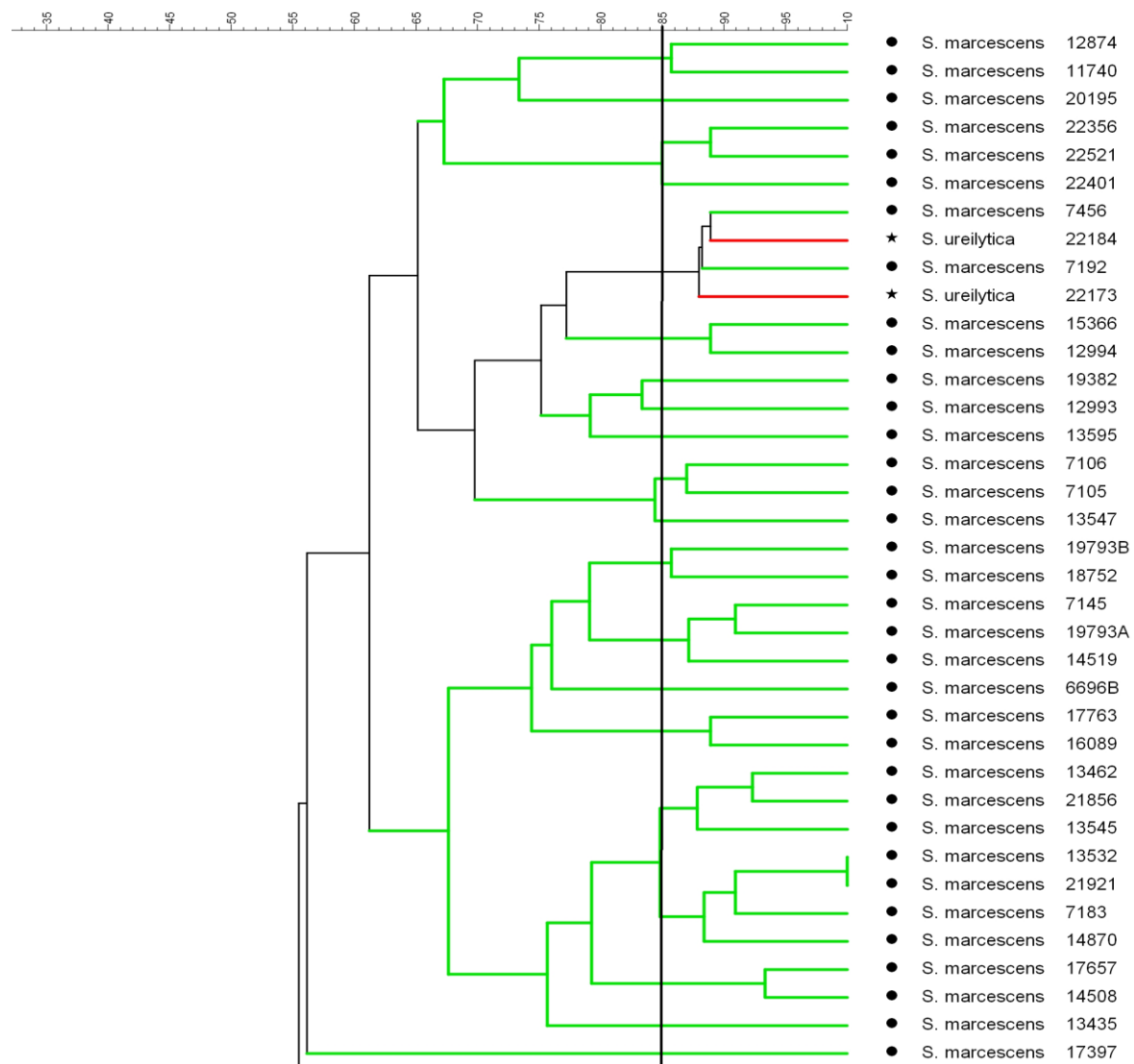
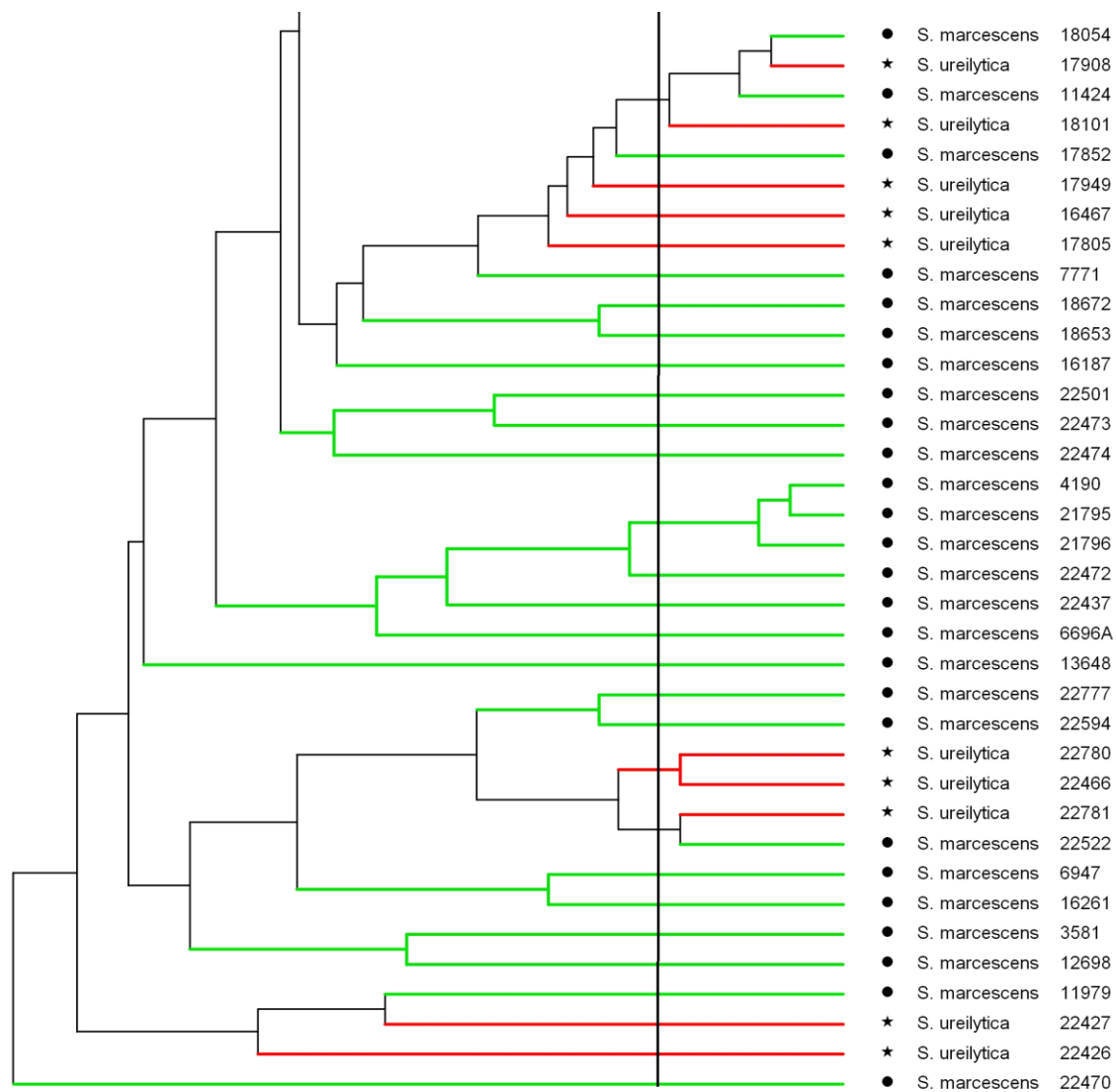


Figura 2 – Dendrograma representando o percentual de proximidade entre as amostras de *Serratia marcescens* e *Serratia ureilytica* (conclusão)



Fonte: A autora, 2022.

A tabela 13 foi elaborada utilizando os perfis de similaridade baseados na análise dos clusters do dendrograma, a partir disso, foi comparado o resultado do teste de sensibilidade das amostras pertencentes ao mesmo perfil.

O perfil 1 está representado pelas amostras 12874 e 11740, oriundas de secreção traqueal e sangue, respectivamente. Apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos e à amicacina, além da resistência à gentamicina, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim. Enquanto a amostra 12874 é suscetível aumentando exposição ao ciprofloxacino, a amostra 11740 exibiu sensibilidade.

O perfil 2 é composto por duas amostras de sangue (22356 e 22521) com perfil multissensível, com exceção da sensibilidade aumentando exposição ao imipenem apresentado pela amostra 22521.

O perfil 3 é constituído por duas amostras de *S. marcescens* (7456 e 7192) e duas de *S. ureilytica* (22184 e 22173), oriundas de sangue. Todas elas exibiram perfil multissensível, exceto a amostra a 7192, que apresentou resistência aos aminoglicosídeos e ao aztreonam, além de ser suscetível aumentando exposição a ciprofloxacino.

Duas amostras compõem o perfil 4 (15366 e 12994), provenientes de urina e secreção traqueal. Apresentaram um perfil suscetível aos carbapenêmicos, resistente a aztreonam, sulfametoxazol-trimetoprim e sensível aumentando exposição a ciprofloxacino. São sensíveis aos aminoglicosídeos, com exceção da amostra 12994 que se mostrou resistente à gentamicina.

O perfil 5 é formado pelas amostras 7105 e 7106, estas exibiram perfis de suscetibilidade idênticos, sendo sensíveis aos carbapenêmicos e resistentes aos outros antimicrobianos testados.

Uma amostra de material fibrinoso do pulmão (19793B) e outra de secreção traqueal (18752) integram o perfil 6. As duas amostras apresentam um caráter multissensível, apenas a amostra 18752 se mostrou resistente ao ciprofloxacino.

O perfil 7 é formado por duas amostras provenientes de sangue (7145 e 14519) e uma de material fibrinoso do pulmão (19793A) que exibiram sensibilidade a todos os antimicrobianos. As amostras 17763 e 16089 oriundas de sangue compõem o perfil 8, sendo as duas multissensíveis.

O perfil 9 é composto pelas amostras 13462, 21856 e 13545 provenientes de materiais diferentes. Duas destas apresentaram perfis idênticos (13462 e 13545), sendo sensíveis aos carbapenêmicos, resistente aos aminoglicosídeos, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim, além de ser sensível aumentando exposição a ciprofloxacino. A amostra 21856 difere por

exibir resistência ao ertapenem, sensibilidade aos aminoglicosídeos e a sulfametoxazol-trimetoprim.

Quatro amostras formam o perfil 10, sendo a amostra 14870 sensível a todos os antimicrobianos. As amostras 13532 e 7183 exibiram um perfil quase idêntico, sendo sensível aos carbapenêmicos, resistente ao aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim, além da sensibilidade aumentando exposição ao ciprofloxacino, diferindo apenas em relação aos aminoglicosídeos, sendo a amostra 7183 sensível apenas à gentamicina. Já a amostra 21921 é resistente ao ertapenem, sensível aos aminoglicosídeos e sensível ao sulfametoxazol-trimetoprim.

O perfil 11 é formado pelas amostras 17657 e 14508, que são sensíveis a todos os antimicrobianos, com exceção da amostra 14508 que exibiu resistência aos aminoglicosídeos, ciprofloxacino, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim.

O perfil 12 é composto por quatro amostras, duas pertencem à espécie *S. marcescens* (18054 e 11424) e duas foram caracterizadas como *S. ureilytica* (17908 e 18101). Todas apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos, apenas a amostra 18101 exibiu resistência ao ertapenem. Somente a amostra 11424 mostrou resistência à amicacina, em relação ao ciprofloxacino, as amostras 18054 e 11424 exibiram sensibilidade aumentando exposição, enquanto a 18101 mostrou resistência e a 17908 sensibilidade. Todas apresentaram resistência ao aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim.

As amostras 4190, 21795 e 21796 que formam o perfil 13, sendo a primeira oriunda de escarro e as outras duas de sangue. Estas apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. O perfil 14 é constituído por duas amostras da espécie *Serratia ureilytica*, sendo a amostra 22466 multissensível, já a 22780 apresentou resistência a todos os carbapenêmicos e ao ciprofloxacino.

O perfil 15 é composto por amostras de espécies distintas, a amostra 22522 (*S. marcescens*) é sensível a todos os antimicrobianos, com exceção do ciprofloxacino. Já a amostra 22781 (*S. ureilytica*) apresentou resistência aos carbapenêmicos, com exceção do meropenem, e resistência à amicacina e ao aztreonam.

Após a análise dos perfis de similaridade e sua relação com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi possível observar que amostras agrupadas no mesmo cluster não apresentaram obrigatoriamente o mesmo perfil de resistência. Apesar da proximidade, não foi verificada uma relação entre as amostras referente a essa questão.

Tabela 13 - Perfil de similaridade entre as amostras e sua correlação com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (continua)

| Perfil | Amostra            | Material                 | Identificação        | MER | IPM | ERT | AK | CN | CIP | AZT | SXT |
|--------|--------------------|--------------------------|----------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| 1      | 12874              | Secreção traqueal        | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | R  | I   | R   | R   |
| 1      | 11740              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | R  | S   | R   | R   |
| 2      | 22356              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 2      | 22521              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | I   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 3      | 7456               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 3      | 22184              | Sangue                   | <i>S. ureilytica</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 3      | 7192               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | S   |
| 3      | 22173              | Sangue                   | <i>S. ureilytica</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 4      | 15366              | Urina                    | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | I   | R   | R   |
| 4      | 12994              | Secreção traqueal        | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | R  | I   | R   | R   |
| 5      | 7106               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |
| 5      | 7105               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |
| 6      | 19793B             | Mat. Fibrinoso do pulmão | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 6      | 18752              | Secreção traqueal        | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | R   | S   | S   |
| 7      | 7145               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 7      | 19793 <sup>a</sup> | Mat. Fibrinoso do pulmão | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 7      | 14519              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 8      | 17763              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 8      | 16089              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | I   | S   | S   |
| 9      | 13462              | Urina                    | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| 9      | 21856              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | R   | S  | S  | I   | R   | S   |
| 9      | 13545              | Secreção traqueal        | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| 10     | 13532              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | I   | R   | R   |
| 10     | 21921              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | R   | S  | S  | I   | R   | S   |
| 10     | 7183               | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | S  | I   | R   | R   |
| 10     | 14870              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 11     | 17657              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 11     | 14508              | Sangue                   | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | R  | R   | R   | R   |

Tabela 13 - Perfil de similaridade entre as amostras e sua correlação com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (conclusão)

| Perfil | Amostra | Material          | Identificação        | MER | IPM | ERT | AK | CN | CIP | AZT | SXT |
|--------|---------|-------------------|----------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| 12     | 18054   | Sangue            | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | I   | R   | R   |
| 12     | 17908   | Secreção traqueal | <i>S. ureilytica</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | R   | R   |
| 12     | 11424   | Secreção traqueal | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | R  | S  | I   | R   | R   |
| 12     | 18101   | Sangue            | <i>S. ureilytica</i> | S   | S   | R   | S  | S  | R   | R   | R   |
| 13     | 4190    | Escarro           | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 13     | 21795   | Sangue            | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 13     | 21796   | Sangue            | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 14     | 22780   | Sangue            | <i>S. ureilytica</i> | R   | R   | R   | S  | S  | R   | S   | S   |
| 14     | 22466   | Escarro           | <i>S. ureilytica</i> | S   | S   | S   | S  | S  | S   | S   | S   |
| 15     | 22781   | Aspirado traqueal | <i>S. ureilytica</i> | I   | R   | R   | R  | S  | S   | R   | S   |
| 15     | 22522   | Sangue            | <i>S. marcescens</i> | S   | S   | S   | S  | S  | R   | S   | S   |

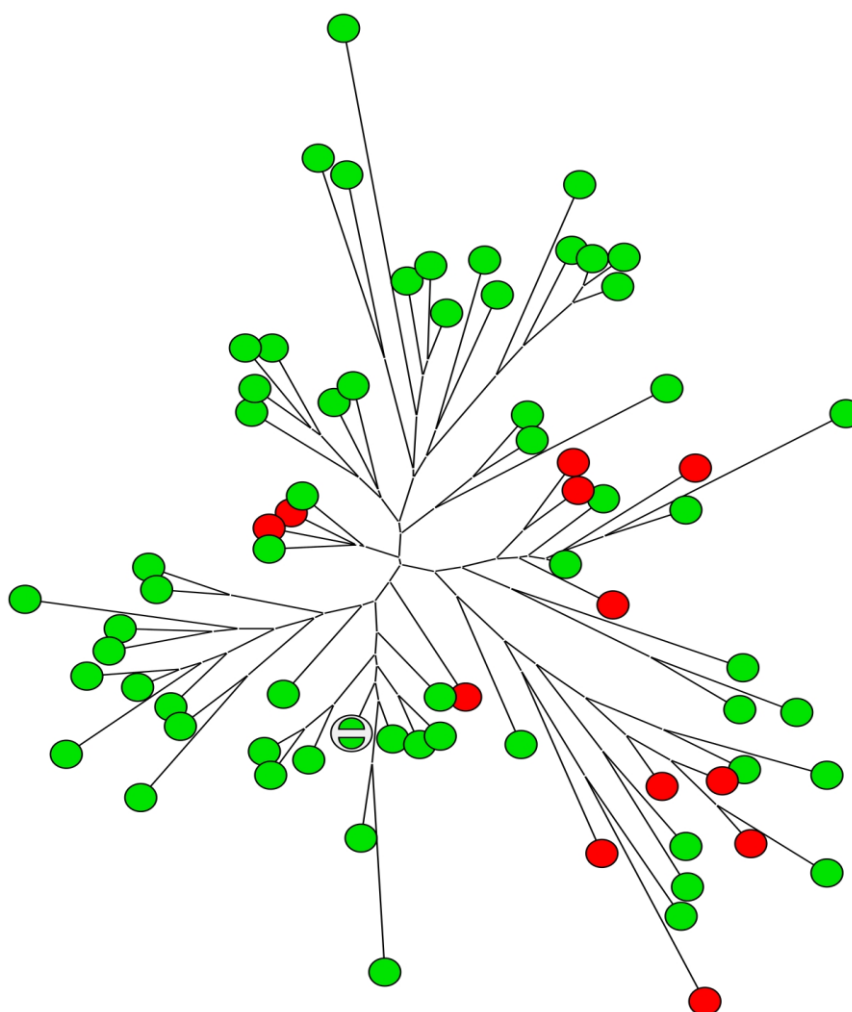
Legenda: MER - meropenem; IPM - imipenem; ERT - ertapenem; AK - ampicilina; CN - gentamicina; CIP - ciprofloxacina; AZT - aztreonam; SXT - sulfametoxazol-trimetoprim.

Fonte: A autora, 2022.

Na figura 3, é possível observar uma árvore sem raízes elaborada para o estudo da relação filoproteômica entre as amostras, estas foram distribuídas em espécie *S. marcescens* (n= 62) e *S. ureilytica* (n= 12), identificadas pela coloração.

Ao analisar, foi visto que as duas espécies compartilhavam ramos na árvore. Apesar de haver uma distinção entre as duas espécies referente ao perfil de espectros e biomarcadores encontrados, não foi possível observar uma diferenciação clara entre ambas em relação à posição de cada espécie nos ramos da árvore filoproteômica, demonstrando que há uma significativa proximidade entre elas.

Figura 3 – Árvore *Neighbor Joining* demonstrando a relação filoproteômica das amostras de *Serratia* spp.



Legenda: Círculo verde: amostras de *S. marcescens*; Círculo vermelho: amostras de *S. ureilytica*.  
Fonte: A autora, 2022.

## 4 DISCUSSÃO

As espécies de *Serratia* spp. causam uma variedade de infecções, como bacteremia, infecções do trato urinário e pneumonia, bem como outras infecções menos comuns, incluindo infecções oculares ou de pele e partes moles. Em nosso estudo, a maioria das amostras foi originária de unidades críticas (CTI e Nefrologia) e isoladas de sangue, corroborando com dados da literatura que apontam que as infecções mais graves causadas por esse microrganismo estão relacionadas a pacientes de unidades críticas, como por exemplo, casos de endocardite infecciosa, doença com notável morbidade e mortalidade (FERREIRA, *et al.*, 2022; IOANNOU, *et al.*, 2022).

Os testes bioquímicos manuais empregados na rotina laboratorial são capazes de identificar, com acurácia, *S. marcescens* (PEREIRA; DA SILVA, 2014). Nesse trabalho, as provas fenotípicas empregadas apresentaram resultados compatíveis com essa espécie em todas as amostras.

Após a realização de testes bioquímicos, foi aplicada a técnica MALDI-TOF para identificação. Conforme os resultados obtidos, 62 amostras foram caracterizadas como *S. marcescens*, 12 amostras como *S. ureilytica* e 29 amostras foram identificadas apenas a nível de gênero. Foi observado que aproximadamente metade das amostras apresentaram  $score \geq 2.00$  na segunda identificação, e que não houve conformidade entre todos os resultados das duas identificações nessas amostras. Isso se deve ao fato de que a diferenciação entre essas duas espécies pelo método MALDI-TOF é dificultada pela alta proximidade filogenética entre as duas espécies, como já demonstrada na literatura pelo sequenciamento do gene RNAr 16S, que demonstrou um percentual de 98,3% de similaridade (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005; DAHDOUH, *et al.*, 2021; PARK, *et al.*, 2021).

Devido a discrepância entre os resultados apresentados pelas duas técnicas anteriores, foi empregado o método de identificação bioquímica automatizada por meio do sistema VITEK® 2, que costuma desempenhar uma boa identificação de enterobactérias (LING, *et al.*, 2001; O'HARA; MILLER, 2003). Para essa análise, foram utilizadas apenas as amostras identificadas como *S. ureilytica* (n=12) pelo MALDI-TOF. Essas amostras foram identificadas como *S. marcescens* e onze delas apresentaram uma taxa de 99% de confiança, indicando uma excelente identificação. Apenas uma amostra apresentou um percentual de 95% de confiança, sugerindo uma identificação muito boa. Essa diminuição do nível de confiança ocorreu devido a discordância no resultado do teste para verificação da enzima

alfa-galactosidase (AGAL). Apesar disso, não houve alteração na identificação (DAHDOUH, *et al.*, 2021; WALLET, *et al.*, 2005).

Foi possível verificar que as espécies *S. marcescens* e *S. ureilytica* possuem perfis bioquímicos muito semelhantes, com exceção de algumas provas, como o teste de hidrólise da arginina, que é positivo no caso de *S. ureilytica*. Além disso, *S. ureilytica* é capaz de utilizar a ureia como única fonte de nitrogênio para o seu crescimento, diferente da *S. marcescens*, que possui apenas 15% de probabilidade de apresentar atividade da enzima urease. Todas as amostras apresentaram resultado negativo para a presença da enzima arginina dihidrolase, e sete das 12 amostras exibiram atividade fraca da enzima urease (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005; DAHDOUH, *et al.*, 2021; OPLUSTIL, *et al.*, 2010).

Devido ao fato dos testes empregados nesse estudo não serem “padrão ouro” para a diferenciação dessas duas espécies, não foi possível afirmar qual dessas metodologias identificou corretamente a espécie, pois é recomendado a realização do sequenciamento de genes conservados (DAHDOUH, *et al.*, 2021; WALLET, *et al.*, 2005).

Com base nos resultados apresentados na análise por espectrometria de massa, foi realizada uma pesquisa de biomarcadores, ou seja, proteínas ribossomais, em sua maioria desconhecidas, com o intuito de encontrar algum elemento que diferenciasses as duas espécies (COLODETTE, 2019; CROXATTO; PROD’HOM; GREUB, 2012).

Ao analisar os picos biomarcadores encontrados, foi observado que as duas espécies apresentaram perfis de espectros distintos. Por meio dessa dissemelhança foi possível distinguir *S. marcescens* de *S. ureilytica* utilizando a espectrometria de massa. Estudos adicionais são necessários para confirmação desses achados através do sequenciamento de genes conservados. Até o momento não há dados na literatura que avaliem a presença de biomarcadores para identificação de *Serratia* spp.

Avaliando a intensidade, verificamos que os picos exibiram baixa intensidade, até mesmo em biomarcadores com alta prevalência entre as amostras. Esse fato deve ser levado em consideração, já que algumas diferenças no processo pré-analítico e analítico podem gerar variações em relação aos resultados apresentados. Além disso, existem picos com a razão massa/carga muito próximas entre as duas espécies, o que pode ser explicado pelo pequeno número de amostras e pela falta de replicatas para validar a presença ou a ausência destes picos.

No entanto, alguns estudos demonstram a capacidade do uso da avaliação de picos para identificação / tipificação de microrganismos. Sauget *et al.* (2016) identificaram 15 picos específicos para o complexo clonal *S. aureus* CC398. Os autores destacaram a capacidade de

discriminação e a possibilidade da sua inclusão em análises de rotina. Satisfatórios também, foram os resultados encontrados por Clark et al. (2013) ao avaliarem patótipos de *E. coli*, como *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). A análise foi capaz de agrupar corretamente os isolados conforme seu patótipo, no entanto, os autores recomendaram a aplicação do método como ferramenta de triagem para posterior confirmação.

Alguns autores salientam que a avaliação de biomarcadores com o propósito de identificação bacteriana, ainda não pode substituir os métodos convencionais, visto que existem diversas variáveis capazes de modificar os resultados da análise, como o preparo da amostra, as condições de crescimento e até as configurações do equipamento, por isso, é recomendado o uso apenas como uma técnica complementar. Porém, foram ressaltadas as vantagens frente as outras metodologias, como a rapidez, o baixo custo e a capacidade de produzir espectros de boa qualidade, essenciais na diferenciação das espécies (PINTO, et al., 2017; ROSERO, et al., 2020; SAUGET, et al., 2017).

Aproximadamente 1/3 das amostras de *Serratia* spp apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, destacando AZT e SXT, cerca de 27% das amostras foram classificadas como MDR. A taxa de resistência ao AZT (n=36; 34,9%), pode ser explicada, em parte, pela possibilidade da presença de ESBL, relacionadas a resistência a esse monobactâmico. Na literatura recente, os relatos de casos de enterobactérias produtoras de ESBL são menos frequentes, visto que há uma prevalência de circulação de carbapenemases por conta da pressão seletiva devido ao uso empírico e excessivo de carbapenêmicos no ambiente hospitalar. A resistência a SXT (n=27; 26,2%) pode estar associada, em parte, a genes plasmidiais como o gene *sul*. Porém, neste trabalho não foram pesquisados genes codificadores de outras enzimas além de carbapenemases (BONNET, et al., 2000; CARVALHAIS, 2015; DA SILVA; LINCOPAN, 2012; GUGLIERI, 2020; KIM; YANG; KIM, 2017; LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010; DOS SANTOS; LEAL; CAVALCANTE, 2016; RODRIGUES; DE MESQUITA, 2016).

Em relação aos carbapenêmicos, foi observado uma taxa de resistência que variou de 1,9% a 15,5%, com destaque para ERT. Os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* costumam apresentar resistência a diversas classes de antimicrobianos, porém, a grande preocupação gira em torno daquelas denominadas ERCs (Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos). No Brasil, o maior problema se dá em razão da produção da enzima KPC, já considerada endêmica (MAGALHÃES; SOARES, 2018; TILAHUN, et al., 2021).

Na análise temporal da resistência aos carbapenêmicos em *Serratia* spp. nesse trabalho, observamos o aparecimento de resistência a pelo menos um dos carbapenêmicos testados no ano de 2013, sem que houvesse uma continuidade desse fenótipo ao longo dos anos. Um possível viés nesse estudo é a ausência de coleta de amostras nos anos de 2009, 2010 e 2016.

Por apresentar resistência intrínseca e adquirida a diferentes classes de antimicrobianos, *Serratia* spp. é classificada como um microrganismo multirresistente. Dentre os 12 perfis MDR observados, a maioria apresentou resistência a pelo menos um dos aminoglicosídeos. A resistência a aminoglicosídeos em *S. marcescens* tem sido relacionada à presença da enzima RmtB (DOI, *et al.*, 2004). Além disso, metade dos perfis MDR exibiram resistência ao ciprofloxacino, isso pode ter relação com as bombas de efluxo RND do tipo SdeAB, já que esse sistema é capaz de conferir resistência intrínseca a fluoroquinolonas em *S. marcescens* (DA CRUZ, *et al.*, 2021; TOBA, *et al.*, 2019).

Foi realizada uma análise comparativa entre os diferentes perfis de resistência observados com os perfis de biomarcadores (n=10) com a finalidade de buscar uma relação, que pudesse ser aplicada como ferramenta de rápido diagnóstico na rotina laboratorial, uma vez que, a presença de perfis de picos específicos já poderia ser relacionada com perfis MDR. Os resultados obtidos na análise comparativa não mostraram associação entre perfis de biomarcadores e os resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, possivelmente devido a maioria das amostras serem sensíveis aos antimicrobianos testados.

Neste trabalho foram pesquisados os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* nas 103 amostras de *Serratia* spp. Apenas três amostras apresentaram produtos de amplificação compatíveis com o gene *bla<sub>KPC</sub>*. A carbapenemase do tipo KPC vem sendo apontada como a mais comumente encontrada em amostras de hospitais brasileiros, incluindo *Serratia* spp. (CAI, *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA, *et al.*, 2014; DE PAULA, *et al.*, 2016; MARGATE, *et al.*, 2015; PINTO, *et al.*, 2014; VIEGAS; SOARES, 2018).

Um estudo conduzido em UTI de um hospital de ensino terciário localizado em Dourados, no Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2011 e 2013 com 30 amostras de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos, apontou que 24 (80%) eram produtoras da enzima KPC-2, entre essas, seis amostras carregavam simultaneamente o gene *bla<sub>IMP-10</sub>*. O autor destaca que os pacientes infectados com essa associação apresentaram uma alta taxa de mortalidade (100%) (SILVA, *et al.*, 2015). Outro trabalho realizado com 54 amostras clínicas de *S. marcescens* isoladas de pacientes da UTI de um hospital em Palmas, Tocantins,

exibiram altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos, sendo confirmada a presença dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>* em todas as amostras (FERREIRA, *et al.*, 2020).

Uma única amostra que apresentou resistência fenotípica aos três carbapenêmicos avaliados, carregava o gene *bla<sub>NDM</sub>*. Essa amostra foi isolada de sangue e identificada como *S. ureilytica* pelo MALDI-TOF. Poucos são os relatos sobre a presença desse gene em *S. marcescens*. Em um estudo com 42 isolados de *S. marcescens* apenas uma amostra exibiu o gene *bla<sub>NDM</sub>*, enquanto 35 amostras foram *bla<sub>KPC-2</sub>* positivo (PRADO, *et al.*, 2022).

Cento e trinta e um isolados de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos de um hospital universitário em Marraquexe, Marrocos, foram analisados. Destes, apenas duas amostras (1%) pertenciam à espécie *S. marcescens*, somente uma exibiu o gene *bla<sub>NDM</sub>* (LOQMAN, *et al.*, 2021). Entretanto, desde sua primeira descrição no Brasil em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF, *et al.*, 2013), tem se observado sua dispersão em membros da ordem *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (DA SILVA, *et al.*, 2019; PEREZ, *et al.*, 2021; PILLONETTO, *et al.*, 2014; WINK, *et al.*, 2021).

Apesar de poucos relatos dessa metalo beta-lactamase em *Serratia* spp., casos de amostras albergando simultaneamente *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* já foram descritos. Em 2020 foi descrito o primeiro caso no Brasil dessa associação em *S. marcescens* resistente a pelo menos um carbapenêmico isolada de três hospitais de Recife entre 2016 e 2018 (FIRMO, *et al.*, 2020). Um ano após esse relato, foi descrito outro episódio envolvendo cinco amostras, oriundas de infecções da corrente sanguínea de pacientes do Hospital das Clínicas em São Paulo, no decorrer de 2012 a 2016, entre essas, apenas uma amostra pertencia à espécie *S. marcescens*, carregando simultaneamente os genes *bla<sub>KPC-2</sub>* e *bla<sub>NDM-1</sub>*, e teve como desfecho clínico o óbito do paciente (BES, *et al.*, 2021).

Além disso, como a metalo beta-lactamase não é capaz de inibir o monobactâmico aztreonam, a amostra em nosso estudo, que foi positiva para *bla<sub>NDM</sub>* apresentou sensibilidade em relação a este antimicrobiano, sendo assim, os resultados obtidos apresentaram conformidade entre si (DA ROSA, *et al.*, 2016; DE PAULA, *et al.*, 2016).

Os resultados fenotípicos de resistência aos carbapenêmicos foram compatíveis nas quatro amostras positivas para os genes de carbapenemase. Porém, as vinte e quatro amostras que apresentaram resistência a pelo menos um dos carbapenêmicos e ausência das carbapenemases, pode ser justificado pela presença de enzimas que não foram pesquisadas nesse estudo (TILAHUN, *et al.*, 2021).

Além disso, a resistência pode estar associada a outros mecanismos que também são encontrados em *S. marcescens*, como bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade de

porinas e alterações na proteína de ligação à penicilina (PBP). Esses mecanismos isolados ou associados a outras enzimas, como as ESBLs e AmpC, são capazes de promover resistência a carbapenêmicos (CODJOE; DONKOR, 2017; YANG, *et al.*, 2012).

A explosão de KPC no HUPE (dados não publicados), ocorreu em 2010, incluindo a descrição do primeiro caso de *E. coli* produtora de KPC no país pelo nosso grupo (CARVALHO-ASSEF, *et al.*, 2010). Adicionalmente, relatamos também, o primeiro caso de co-infecção, em *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de KPC recuperadas de um mesmo paciente (LEÃO, *et al.*, 2011a). Embora raro, descrevemos o primeiro caso no mundo de produção de KPC em uma amostra de *K. pneumoniae* recuperadas de pacientes com FC (LEÃO, *et al.*, 2011b).

Apesar de não ter sido identificado nesse estudo, o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> foi descrito em *S. marcescens* por Regev-Yochay et al. (2018), em um surto ocorrido durante os anos de 2016 e 2017 numa UTI em Israel causado por 32 isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemase OXA-48, sendo 81% destas identificadas como *S. marcescens*.

Foi descrito por Barbosa (2011) uma nova carbapenemase denominada GES-16 em duas amostras de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos isoladas em 2005 de amostra sanguínea e secreção brônquica de dois pacientes do HUPE. As amostras pertenciam ao mesmo complexo clonal e o gene *bla*<sub>GES</sub> estava localizado em cassetes gênicos incorporados em integrons de classe 1, e localizado em um plasmídeo não-conjugativo. Possivelmente, esse fato pode justificar a ausência desse gene nas amostras do presente estudo.

Além desse caso, outras descrições de *Serratia* spp. produtora de carbapenemase do tipo GES foram relatadas. Nodari et al. (2017) identificaram pela primeira vez no Brasil a enzima GES-5 em uma amostra de *S. marcescens* apresentando altos níveis de resistência a carbapenêmicos, oriunda de líquido ascítico de um paciente de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em 2014. Pinto et al. (2014) investigaram 701 amostras de ERC em um complexo hospitalar em Porto Alegre, desse total, 26 (3,7%) amostras eram *Serratia* spp., e destas, 23 (88,5%) eram positivas para a enzima KPC, e 1 (3,8%) para a enzima GES.

Poucos são os relatos de variantes GES com atividade de carbapenemase em *Serratia* spp. no Brasil. Os genes codificadores de GES são comumente localizados em cassetes gênicos incorporados em integrons de classe 1, geralmente relacionados a elementos genéticos móveis, e como descrito anteriormente, estes podem ser perdidos na ausência de pressão seletiva, portanto, esse fato explicaria a rara circulação dessa enzima em *Serratia* spp. (BARBOSA, 2011; LOOT, *et al.*, 2017; PINTO, 2013; WEIN, *et al.*, 2019; WEIN, *et al.*, 2020).

Ao avaliarmos o dendrograma a partir do ponto de corte estabelecido, foi possível agregar as amostras em 15 agrupamentos, indicando que havia uma relação de alta proximidade entre essas amostras, inclusive entre espécies distintas. Além disso, ao verificarmos a ligação entre as amostras agrupadas e o seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, observamos que não há uma associação entre essas duas propriedades, visto que a maioria das amostras apresentaram um perfil multissensível, dificultando a análise.

Posteriormente, ao observar a árvore filoproteômica confirmamos o fato de que as duas espécies são intimamente relacionadas, visto que não estavam dispostas em ramos diferentes. Apesar dessa alta similaridade, nosso estudo demonstra a possibilidade de realizar a discriminação entre as duas espécies através da espectrometria de massa, pois verificamos que há diferenças claras entre os perfis de biomarcadores específicos capazes de determinar sua identificação.

Contrariamente aos resultados obtidos em nosso trabalho, em um estudo aplicando esta mesma análise com amostras de *Corynebacterium* spp., foi possível distingui-las em agrupamentos com indivíduos das mesmas espécies (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. glutamicum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. minutissimum*, *C. diphtheriae*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. afermentans* subsp. *afermentans*, *C. propinquum*, *C. coyleae*, *C. ulcerans*, *C. lactis*, *C. bovis*, *C. stationis*, *C. durum*, *C. imitans*, *C. accolens*, *C. aurimucosum*, *C. falsenii*, *C. jeikeium* e *C. resistens*). A análise dos espectros revelou maior correlação entre as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* e, por sua vez, uma perfeita discriminação delas com outras espécies do gênero (COLODETTE, 2019).

O estudo demonstrou a dificuldade do MALDI TOF em caracterizar as duas espécies de *Serratia* spp., pois segundo Rocca et al. (2020), no banco de dados só há um perfil proteico relacionado à espécie *S. ureilytica*, sendo assim, é indicado a associação com outras técnicas a fim de realizar a identificação corretamente.

## CONCLUSÕES

As provas bioquímicas tradicionais foram capazes de identificar as amostras incluídas nesse estudo como *S. marcescens*.

A espectrometria de massa, quando aplicada à identificação, apresentou uma caracterização confiável a nível de gênero e não demonstrou ser capaz de uma discriminação segura entre *S. marcescens* e *S. ureilytica* em poucas amostras.

A análise de biomarcadores obtidos pela espectrometria de massa foi capaz de identificar vinte e quatro picos espécie específico para *S. marcescens*, por outro lado, quarenta e oito biomarcadores foram observados exclusivamente em *S. ureilytica*. Até o momento não há dados na literatura que avaliem a presença de biomarcadores para identificação de *Serratia* spp.

A relação entre a presença dos picos e sua respectiva intensidade, nesse caso, não pode ser tida como parâmetro para determinar biomarcadores, devido ao limitado número de amostras e a ausência de replicatas para validação.

Ao utilizar o sistema automatizado VITEK® 2 para a análise das amostras identificadas como *S. ureilytica* pelo MALDI TOF, estas foram caracterizadas como *S. marcescens*, com elevado percentual de confiança.

A não concordância entre os testes empregados para identificação das espécies de *Serratia* spp. em algumas amostras, sugere a necessidade de confirmação por meio do sequenciamento de genes conservados.

Menos de um terço das amostras foram classificadas como MDR, dentre essas, foi percebido uma alta taxa de resistência aos aminoglicosídeos, aztreonam e sulfametoxazol-trimetoprim. Em relação aos carbapenêmicos, foi observado uma baixa taxa de resistência que variou de 1,9% a 15,5%, com destaque para ertapenem.

Não foi possível a correlação entre perfis idênticos de biomarcadores e perfil de resistência. Possivelmente, devido as altas taxas de sensibilidade aos antimicrobianos na amostragem deste trabalho.

Apenas três amostras carregavam o gene *bla<sub>KPC</sub>* e uma era portadora do gene *bla<sub>NDM</sub>*, e todas foram resistentes aos carbapenêmicos no teste de disco-difusão. Os dados sugerem a importância da investigação de genes plasmidiais com ação de carbapenemase em *Serratia* spp.

Não foi detectado a carbapenemase GES-16 entre as amostras de *Serratia* spp. analisadas. Essa enzima teve sua primeira descrição em duas amostras de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos (2005) no mesmo hospital de origem das amostras incluídas no presente estudo. O gene *bla<sub>GES</sub>* estava localizado em cassetes gênicos incorporados em integrons de classe 1, e localizado em um plasmídeo não-conjugativo. Possivelmente, esse fato pode justificar a não disseminação desse gene no hospital do estudo.

A análise dos agrupamentos baseado nos espectros de massa obtidos entre as amostras de *Serratia* spp. apresentou uma alta similaridade entre elas. No presente estudo, não foi observado relação entre os agrupamentos e os perfis de resistência aos antimicrobianos. Esse dado pode estar relacionado ao grande número de amostras multissensível, ao pequeno número de marcadores de resistência e a alta similaridade entre as amostras.

A árvore filoproteômica gerada não mostrou discriminação entre *S. marcescens* e *S. ureilytica*, indicando uma grande proximidade entre essas espécies.

A identificação de *S. ureilytica* exclusivamente pelo MALDI TOF, em oposição as outras metodologias empregadas, chama a atenção para a dificuldade de identificação entre espécies com espectros proteicos muito próximos, sugerindo nesse caso a utilização de metodologias adicionais.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, M.A.P. Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição in vitro ao imipenem. 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- ALMEIDA, M.M. Caracterização fenotípica e molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos isoladas de secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- ALVIM, A.L.S.; COUTO, B.R.G.M.; GAZZINELLI, A. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por Enterobactérias produtoras de carbapenemase. *Revista da Escola de Enfermagem da USP, Minas Gerais*, v. 53, 2019.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Londres, v. 289, n. 1036, p. 321-31, mai. 1980.
- ANDERSEN, D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children*, EUA, v. 56, n. 2, p. 344-399, 1938.
- ANGLES-YANQUI, E.; HUARINGA-MARCELO, J.; SACSQUISPE-CONTRERAS, R.; PAMPA-ESPINOZA, L. Panorama de las carbapenemasas em Perú. *Revista Panamericana de Salud Pública*, Peru, v. 44, set. 2020.
- ARANDA, C.M.A.; ARIAS, C.A.; TEJADA, C.E.; FORDE, C.; PARK, B.; ROSSI, F.; THORMANN, M. Scientific evidence for the control of antimicrobial resistance. *Revista Panamericana de Salud Pública*, México, v. 44, dez. 2020.
- ARAÚJO, B.T.; PEREIRA, D.C.R. Políticas para controle de infecções relacionada à assistência à saúde (IRAS) no Brasil, 2017. *Comunicação em Ciências da Saúde*, Brasília, v. 28, n. 3, p. 333-342, 2017.
- ARSLAN, U; ERAYMAN, I; KIRDAR, S; YUKSEKKAYA, S; CIMEN, O; TUNCER, I; BOZDOGAN, B. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics International*, Turquia, v. 52, n. 2, p. 208-12, abr. 2010.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Current protocol in molecular biology. 1 ed. New York: Editora John Wiley & Sons, 1987.
- BARBOSA, P.P. Caracterização genética e bioquímica da GES-16, uma nova variante de  $\beta$ -lactamase do tipo GES com atividade carbapenemase em *Serratia marcescens*. 2011. 161f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2011.

BASSANI, J.C. Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D.G.J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistanc. *FEMS Microbiology Reviews*, Suécia, v. 42, n. 1, jan. 2018.

BES, T; NAGANO, D; MARTINS, R; MARCHI, A.P; PERDIGÃO-NETO, L; HIGASHINO, H; PRADO, G; GUIMARAES, T; LEVIN, A.S; COSTA, S. Bloodstream Infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, São Paulo, v. 20, n.1, p. 57, ago. 2021.

BHADRA, B.; ROY, P.; CHAKRABORTY, R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, India, v. 55, p. 2155-2158, set. 2005.

BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N.; OLIVEIRA, T.L.; ARAÚJO, F.R.; VERBISCK, N.V. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37 n. 12. dez. 2017.

BONNET, R; SAMPAIO, J.L.M; CHANAL, C; SIROT, D; DE CHAMPS, C; VIALARD, J.L; LABIA, R; SIROT, J. A novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 11, p. 3061-3068, nov. 2000.

BOU ZERDAN, M.; AL HASSAN, S.; SHAKER, W.; EL HAJJAR, R.; ALLAM, S.; BOU ZERDAN, M.; NAJI, A.; ZEINEDDINE, N. Carbapenemase inhibitors: updates on developments in 2021. *Journal of Clinical Medicine Research*, Estados Unidos, v. 14, n. 7, p. 251-259, jul. 2022.

BRAGA, F.S. *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas de pacientes com fibrose cística e sem fibrose cística: caracterização molecular da resistência a antimicrobianos. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BrCAST. Resistência intrínseca e fenótipos raros. Versão 3.2, 2020 do EUCAST.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BrCAST. Tabelas de ponto de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 9.0, 2019 do EUCAST.

CABRERA, D.A.E. Análise de biomarcadores proteicos para estudos de identificação, resistência e variabilidade em *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

- CAI, J.C.; ZHOU, H.W.; ZHANG, R.; CHEN, G.X. 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 Chemotherapy*, China, v. 52, n. 6, p. 2014-2018, mar. 2008.
- CALLE-MIGUEL, L.; RIAÑO, G.M.; CARBAJO, A.I.I.; ÁLVAREZ, M.A.A.; MARTÍNEZ, C.V.; SÁNCHEZ, G.S. Variabilidade entre áreas sanitárias em el consumo extrahospitalario de antibióticos de uso sistémico em la población pediátrica del Principado de Asturias, España (2005-2018). *Revista española de quimioterapia*, Asturias, Espanha, v. 34, n.2, p. 107-114, jan. 2021.
- CARRERO, P.; GARROTE, J.P.; PACHECO, S.; GARCÍA, A.I.; GIL, R.; CARBAJOSA, S.G. Report of six cases of human infection by *Serratia plymuthica*. *Journal of Clinical Microbiology*, Espanha, v. 33, n. 2, p. 275-276, fev. 1995.
- CARVALHAIS, A.R.M.C. Caracterização de genes de resistência a antibióticos em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de suiniculturas de produção intensiva e extensiva de Portugal. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.
- CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; LEÃO, R.S.; SILVA, R.V.D.A.; FERREIRA, A.G.; SEKI, L.M.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, Brasil, v. 68, n. 3, p. 337-8, nov. 2010.
- CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R.M.; BERIÃO, G.C.; CHAGAS, T.P.G.; TIMM, L.N.; DA SILVA, R.C. F.; FALCI, D.R.; ASENSI, M.D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *The Journal of Antimicrobial Chemoteraphy*, Brasil, v. 68, n. 12, p. 2956-7, dez. 2013.
- CLARK, C.G.; KRUCZKIEWICZ, P.; GUAN, C.; MCCORRISTER, S.T.; CHONG, P.; WYLIE, J.; CAESELE, P.V.; TABOR, H.A.; SNARR, P.; GILMOUR, M.W.; TABOADA, E.N.; WESTMACOTT, G.R. Evaluation of MALDI TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *Journal of Microbiological Methods*, Canadá, v. 94, p. 180-191, jun. 2013.
- CLARK, R.B.; JANDA, J.M. Isolation of *Serratia plymuthica* from a human burn site. *Journal of Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 656-7, abr. 1985.
- CODJOE, F.S.; DONKOR, E.S. Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, v. 6, n. 1, p. 1, dez. 2017.
- COLODETTE, S.S. Avaliação dos aspectos clínicos, perfil molecular e virulência de amostras de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isoladas de nasofaringes de crianças admitidas em um Hospital Universitário do Estado do Rio de Janeiro. 2019. 125f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.
- COSTA, F.J.M.D. Resistência à polimixina B em bactérias gram-negativas carbapenemos resistentes isoladas em hospitais do Rio Grande do Norte. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado

em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

CRISTINA, M.L.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A.M. *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUS). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Itália, v. 16, n. 4, p. 610, fev. 2019.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 380-407, mar. 2012.

DA CRUZ, T.P.P.S.; DE AZEVEDO, F.K.S.F.; PEPATO, M.A.; DE SOUSA, A.T.H.I.; RIZZO, P.S.; SOUTO, F.J.D.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Outbreak of KPC-2 producing *Serratia marcescens* MDR in a tertiary hospital in the Midwest region, Brazil. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, jul. 2021.

DAHDOUH, E.; LÁZARO-PERONA, F.; RUIZ-CARRASCOSO, G.; GARCÍA, L.S.; DE PIPAÓN, M.S.; MINFORANCE, J. Intestinal dominance by *Serratia marcescens* and *Serratia ureilytica* among neonates in the setting of an outbreak. *Microorganisms*, Espanha, v. 9, n. 11, p. 2271, nov. 2021.

DAI, X.; CHEN, S.; LI, N.; YAN, H. Quantitative and qualitative validations of a sonication-based DNA extraction approach for PCR-based molecular biological analyses. *Analytical Biochemistry*. v. 501 p. 44-6. may. 2016.

DAOUDI, A.; BENAOU, F.; SLITINE, N.E.I.; SORAA, N.; MAOULAININE, F.M.R. An outbreak of *Serratia marcescens* in a Moroccan Neonatal Intensive Care Unit. *Advances Medicine*, Marrocos, v. 2018, p. 4867134, nov. 2018.

DA ROSA, T.J.; BIEGELMEYER, S.; LANGE, T.S.; BITTENCOURT, S.E.B.; PICOLI, S.U. New Delhi metalobetalactamase (NDM): uma revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Brasil, fev. 2016.

DA SILVA, I.R.; AIRES, C.A.M.; CONCEIÇÃO-NETO, O.C.; SANTOS, I.C.O.; PEREIRA, N.F.; SENNA, J.P.M.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; ASENSI, M.D.; ROCHA-DE-SOUZA, C.M. Distribution of clinical NDM-1 producing gram-negative bacteria in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, Brasil, v. 25, n. 3, p. 394-399, abr. 2019.

DA SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Brasil, v. 48, n. 2, abr. 2012.

DE ALMEIDA, T.V.; MORE, J.C.R.S.; GEBARA, C.; CASSIMIRO, P.P.N.B.; SILVA, M.A.P.; NICOLAU, E.S. Resistência antimicrobiana em patógenos causadores de mastite. *Revista Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 1, p. 230-244, ago. 2021.

DE MATOS, A.P. Avaliação da microbiologia e da cultura quantitativa bacteriana de amostras de pacientes com fibrose cística. 2005. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2005.

DE MELO, L.F. A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico. 2014. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Microbiologia Industrial e Ambiental) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DE OLIVEIRA, P.M.R; MACIEL, W.G; SILVA, J.L.S.C; DA SILVA, K.E; CORREA, M.E; VASCONCELOS, N.G; SACCHI, F.P.C; CRODA, M.T.R.C.G; NEGRÃO, F.J; CRODA, J.H.R; SIMIONATTO, S. Identification of carbapenemase genes in *Serratia* spp. *BMC Proceedings*, Brasil, v. 8, p. 39, out. 2014.

DE PAULA, N.M.C.; DA COSTA, T.L. Prevalência de infecções causadas por bactérias gram-negativas produtoras de carbapenemase em um hospital terciário de Goiânia-Goiás. *Revista Estudo Vida e Saúde*, Goiás, v. 45, p. 107-114, dez. 2018.

DE PAULA, V.G; QUINTANILHA, L.V; SILVA, F.A.C; DA ROCHA, H.F; DOS SANTOS, F.L. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: prevenção da disseminação de superbactérias em UTI's. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 175-185, jul./dez. 2016.

DOI, Y; YOKOYAMA, K; YAMANE, K; WACHINO, J; SHIBATA, N; YAGI, T; SHIBAYAMA, K; KATO, H; ARAKAWA, Y. Plamid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Japão, v. 48, n. 2, p. 491-496, fev. 2004.

DOS SANTOS, L.D.V; LEAL, M.E.L; CAVALCANTE, A.C.A. Presença de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas. 2016. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário Tabosa de Almeida, Pernambuco, 2016.

DOS SANTOS, P.C.F.; MARTINS, M.J.L. Infecções relacionadas à assistência à saúde na UTI neonatal: Uma revisão integrativa. *Revista Científica Humanidades e Tecnologia*, v. 3, n. 2, p. 6-191, jul./dez. 2019.

DOS SANTOS, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549 sob fermentação em estado sólido e avaliação do seu potencial antimicrobiano. 2020. 107 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2020.

DUARTE, C.A.O. Abordagens do tratamento terapêutico aos pacientes portadores de fibrose cística nos acometimentos pulmonares. 2017. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel de Farmácia) – Faculdade do Instituto Brasil, Anápolis, Goiás, 2017.

FARIA, P.N; CECON, P.R; DA SILVA, A.R; FINGER, F.L; SILVA, F.F; CRUZ, C.D; SÁVIO, F.L. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. *Horticultura Brasileira*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 428-432, jul./set. 2012.

FERREIRA, A.I.; OLIVEIRA E SILVA, F.; REIS, J.; HENRIQUES, M.; ALMEIDA, J. *Serratia marcescens* endocarditis: a case report and literature review. *Acta Medica Portuguesa*, Portugal, mai. 2022.

FERREIRA, J.A. Detecção e identificação rápidas dos principais contaminantes microbiológicos em fármacos por espectroscopia de infravermelho. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Farmacêutica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

FERREIRA, R.L.; REZENDE, G.S.; DAMAS, M.S.F.; SILVA, M.O.; SILVA, A.P.; BRITO, M.C.A.; LEONARDECZ, E.; DE GÓES, F.R.; CAMPANINI, E.B.; MALAVAZI, I.; DA CUNHA, A.F.; PRANCHEVICIUS, M.C.S. Characterization of KPC-producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit of a Brazilian Tertiary Hospital. *Frontiers in Microbiology*, Brasil, v. 11, p. 956, mai. 2020.

FERRER, R.; SORIANO, A.; CANTÓN, R.; DEL POZO, J.L.; GARCÍA-VIDAL, C.; GARNACHO-MONTERO, J.; LARROSA, N.; RASCADO, P.; SALAVERT, M.; PINTADO, V.; PELLICER, B.; BADÍA, X. Revisión sistemática de la literatura y análisis de expertos sobre los factores de riesgo asociados a infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos em pacientes adultos em España. *Revista Española de Quimioterapia*, Espanha, v. 34, n. 4, p. 298-307, abr. 2021.

FÍRMIDA, M.C. Impacto clínico da infecção por *Achromobacter xylosoxidans* na fibrose cística. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

FIRMO, E.F.; BELTRÃO, E.M.B.; SILVA, F.R.F.D.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A.; VERAS, D.L.; LOPES, A.C.S. Association of *bla*<sub>NDM-1</sub> with *bla*<sub>KPC-2</sub> and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Brasil, v. 21, p. 255-261, jun. 2020.

GENTILE, D.; PÉREZ, M.; CENTELLES, M.J. Bacteremia by a *Serratia rubidaea* with na atypical quinolones resistance phenotype. *Revista Chilena de Infectologia*, Espanha, v. 31, n. 3, jun. 2014.

GUGLIERI, T.F. Novas combinações de beta-lactâmico/ inibidores de beta-lactamases (meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam): mecanismos de ação e resistência. 2020. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Microbiologia Clínica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2020.

HOROWITZ, H.W.; NADELMAN, R.B.; VAN HORN, K.G.; WEEKES, S.E.; GOYBURU, L.; WORMSER, G.P. *Serratia plymutica* sepsis associated with infection of central venous cateter. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 8, p. 1562-3, ago. 1987.

HUANG, X.; SHEN, S.; SHI, Q.; DING, L.; WU, S.; HAN, R.; ZHOU, X.; YU, H.; HU, F. First report of *bla*<sub>IMP-4</sub> and *bla*<sub>SRT-2</sub> coproducing *Serratia marcescens* clinical isolate in China. *Frontiers in Microbiology*, China, v. 12, out. 2021.

HUBER, C.A.; REED, S.J.; PATERSON, D.L. Bacterial sub-species typing using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: What is promising? *Current Issues in Molecular Biology*, Austrália, v. 43, n. 2, p. 749-757, jul. 2021.

IKUMAPAYI, U.N.; KANTEH, A.; MANNEH, J.; LAMIN, M.; MACKENZIE, G.A. An outbreak of *Serratia liquefaciens* at a rural health center in the Gambia. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, n. 8, p. 791-8, ago. 2016.

IOANNOU, P.; ALEXAKIS, K.; SPENTZOURI, D.; KOFTERIDIS, D.P. Infective endocarditis by *Serratia* species: a systematic review. *Journal of Chemotherapy*, v. 24, p.1-13, fev. 2022.

IOVENE, M.R; POTA, V; GALDIERO, M; CORVINO, G; DI LELLA, F.M; STELITANO, D; PASSAVANTI, M.B; PACE, M.C; ALFIERI, A; DI FRANCO, S; AURILIO, C; SANSONE, P; NIVAS, V.K.M; FIORE, M. First italian outbreak of VIM-producing *Serratia marcescens* in na adult polyvalent intensive care unit, august-october 2018: a case report and literature review. *World Journal of Clinical Cases*, Itália, v. 7, n. 21, p. 3535-3548, nov. 2019.

JIANG, F.; KONG, Z.; CHENG, C.; KANG, H.; GU, B.; MA, P. Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem -resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. *Epidemiology and Infection*, v. 147, nov. 2019.

KARGER, A.; Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for identification and typing of bactéria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Proteomics Clinical Applications*, v. 10, n. 9, p. 982-993, out. 2016.

KARKEY, A.; JOSHI, N.; CHALISE, S.; JOSHI, S.; SHRESTHA, S.; THI NGUYEN, T.N.; DONGOL, S.; BASNYAT, B.; BAKER, S.; BOINETT, C.J. Outbreaks of *Serratia marcescens* and *Serratia rubidaea* bacteremia in a central Kathmandu hospital following the 2015 earthquakes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 112, n. 10, p. 467-472, out. 2018.

KIM, Y. H; YANG, E.M; KIM, C.J. Infecção do trato urinário causada por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado adquiridas na comunidade em neonatos. *Jornal de Pediatria*, Brasil, v. 93, n. 3, mai./jun. 2017.

LAGIER, J.C.; HUGON, P.; KHELAIFIA, S.; FOURNIER, P.E.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, França, v. 28, n. 1, p. 237-264, jan. 2015.

LAGO, A; FUENTEFRIA, S.R; FUENTEFRIA, D.B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 4, p. 430-434, jul./ago. 2010.

LEÃO, R.S.; CARVALHO-ASSEF, A.P. CORREAL, J.C.; GOLDEMBERG, D.C.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a cateter-related infection. *Clinical Microbiology Infection*, Brasil, v. 17, n. 3, p. 380-2, mar. 2011a.

LEÃO, R.S.; PEREIRA, R.H.; FOLESCU, T.W.; ALBANO, R.M.; SANTOS, E.A.; JUNIOR, L.G.; MARQUES, E.A. KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, Brasil, v. 10, n. 2, p. 140-2, mar. 2011b.

LEE, P.Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C.Y.; KIM, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*. n. 62 p. 3923. apr. 2012.

LIMA, D.F. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina infectando cronicamente pacientes com fibrose cística: caracterização dos clones. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

LING, T.K.; TAM, P.C.; LIU, Z.K.; CHENG, A.F. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, China, v. 39, n. 8, p. 2964-2966, ago. 2001.

LIN, Q.Y.; TSAI, Y.L.; LIU, M.C.; HSUEH, P.R.; LIAW, S.J. *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, China, v. 58, n. 9, p. 5181-90, set. 2014.

LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 16 jun. 2022.

LI, Z.; XU, M.; WEI, H.; WANG, L.; DENG, M. RNA-seq analyses of antibiotic resistance mechanisms in *Serratia marcescens*. *Molecular Medicine Reports*, China, v. 20, n. 1, p. 745-754, jul. 2019.

LOOT, C.; NIVINA, A.; CURY, J.; ESCUDERO, J.A.; DUCOS-GALAND, M.; BIKARD, D.; ROCHA, E.P.C.; MAZEL, D. Differences in integron cassette excision dynamics shape a trade-off between evolvability and genetic capacitance. *American Society for Microbiology*, França, v. 8, n. 2, mar. 2017.

LÓPEZ-RAMOS, I.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; GUTIÉRREZ, M.P.; ZARZOSA, P.; ORDUÑA, A.; MARCH, G.A. Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, v. 177, out. 2020.

LOQMAN, S.; SORAA, N.; DIENE, S.M.; ROLAIN, J.M. Dissemination of carbapenemases (OXA-48, NDM and VIM) producing *Enterobacteriaceae* isolated from the Mohamed VI University Hospital in Marrakech, Morocco. *Antibiotics*, v. 10, n. 5, p. 492, mai. 2021.

LOUREIRO, R.J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T.; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, Portugal, v. 34, n. 1, p. 77-84, jan./abr. 2016.

MAGALHÃES, V.C.R.; SOARES, V.M. Análise dos mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de referência em doenças infecto-contagiosas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 50, n. 3, 2018.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-

resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268-81, mar. 2012.

MAHLEN, S.D. *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 24, n. 4, p. 755-791, out. 2011.

MARDANOVA, A.M.; BOGOMOL'NAIA, L.M.; ROMANOVA, I.; SHARIPOVA, M.R. [Efflux systems in *Serratia marcescens*]. *Mikrobiologiya*, Rússia, v. 83, n. 1, p. 3-14, jan/fev. 2014.

MARGATE, E.; MAGALHÃES, V.; FEHLBERG, L.C.C.; GALES, A.C.; LOPES, A.C.S. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Brasil, v. 57, n. 4, jul./ago. 2015.

MARQUES, E.A. Perfil microbiológico na fibrose cística. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, dez. 2011.

MARTINEAU, C.; LI, X.; LALANCETTE, C.; PERREAULT, T.; FOURNIER, E.; TREMBLAY, J.; GONZALES, M.; YERGEAU, E.; QUACH, C. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: new insights from next-generation sequencing applications. *Journal of Clinical Microbiology*, Canadá, v. 56, n. 9, set. 2018.

MARTINS, L.A.; DOS SANTOS, L. Acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes com fibrose cística na internação pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Revista Infarma*, Porto Alegre, v. 18, n. 7/8, 2006.

MENEZES, E.A.; CEZAFAR, F.C.; ANDRADE, M.S.S.; ROCHA, M.V.A.P.; CUNHA, F.A. Frequência de *Serratia* sp em infecções urinárias de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia em Fortaleza. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 1, fev. 2004.

MOMOSE, T.; MASUTANI, S.; OSHIMA, A.; KAWASAKI, H.; TANAKA, R.; IWAMOTO, Y.; ISHIDO, H.; SENZAKI, H. First pediatric case of infective endocarditis caused by *Serratia liquefaciens*. *International Heart Journal*, v. 59, n. 6, p. 1485-1487, nov. 2018.

MONTEIRO, J., et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67 n. 4 p. 906-9. apr. 2012.

MORADIGARAVAND, D.; BOINETT, C.J.; MARTIN, V.; PEACOCK, S.J.; PARKHILL, J. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*, United Kingdom, v. 26, n. 8, p. 1101-1109, ago. 2016.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52 n. 4 p. 1257-1263. apr. 2008.

NAKANISHI, N.; KOMATSU, S.; IWAMOTO, T.; NOMOTO, R. Characterization of a novel plasmid in *Serratia marcescens* harbouring bla<sub>GES-5</sub> isolated from a nosocomial outbreak in Japan. *Journal of Hospital Infection*, v. 121, p. 128-131, mar. 2022.

NODARI, C.S; SIEBERT, M; MATTE, U.S; BARTH, A.L. Draft genome sequence of a GES-5-producing *Serratia marcescens* isolated in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Brasil, v. 48, n. 2, p. 191-192, abr./jun. 2017.

NORDMANN, P., POIREL, L; CARRER, A; TOLEMAN, M.A; WALSH, T.R. How to detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology*, França, v. 49 n. 2 p. 718-21. fev. 2011.

O'HARA, C.M.; MILLER, J.M. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB Assay for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and prure nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 2096-2101, mai. 2003.

OLAITAN, A.O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 643, nov. 2014.

OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Organização Mundial de Saúde, OMS, 2017. *Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. Disponível em: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

PARENTE, T.M.L. Análise do perfil de resistência a antibióticos e da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em isolados ambientais, orais e extra-orais de *Serratia marcescens*. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará. Sobral, Ceará, 2010.

PARK, J.H; JANG, Y; YOON, I; KIM, T.S; PARK, H. Comparison of Autof ms1000 and Bruker Biotyper MALDI-TOF MS platforms for routine identification of clinical microorganisms. *BioMed Research International*, República da Coreia, v. 2021, p. 6667623, mar. 2021.

PASCUAL, R.P.; GALYAÑ, C.A.; PACHECO, I.T.; MORENTE, A.A.; BRICEÑO, H.G.; PÉREZ, C.B. Necrotic cellulitis by *Serratia plymuthica*. *European Journal of Internal Medicine*, v. 14, n. 8, p. 501-503, dez. 2003.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, Rochester, MN, v. 61, ed. 1, p. 100-111, jan. 2015.

PERANTONI, L.M; QUEIROZ-FERNANDES, G.M. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. *Salusvita*, Bauru, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019

PEREIRA, K.L.F.; DA SILVA, A.C. Identificação bioquímica e antimicrobiana de bactéria hospitalar. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2014, São Paulo. São Paulo: Semesp, 2014.

PERES, B.M. Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares. 2017. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PEREZ, L.R.R.; CARNIEL, E.; NARVAEZ, G.A. Emergence of NDM-producing *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients and impact on antimicrobial therapy during the coronavirus disease 2019 covid-19 pandemic. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, p. 1-3, jun. 2021.

PFAENDLER, H.R.; SCHMIDT, H.U.; FREIDANK, H. The novel carbalux test for carbapenemases and carbapenem deactivating AmpC beta-lactamases. *Frontiers in Microbiology*, Alemanha, v. 11, nov. 2020.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, França, v. 46, n. 1, p. 1-11, jan. 2002.

PILLONETTO, M.; AREND, L.; VESPERO, E.C.; PELISSON, M.; CHAGAS, T.P.G.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; ASENSID, M.D. Primeiro relatório de produção de *Acinetobacter baumannii* de produção de NDM-1 tipo 25 no Brasil. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 58, n. 12, p. 7592-7594, dez. 2014.

PINTO, C.O. Pesquisa de integron classe 1 e cassete gênico em *Escherichia coli* recuperadas de indivíduos sadios e infectados e em DNA de sedimento contaminado por arsênio. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013.

PINTO, F.M.; SIMAS, D.M.; BALDIN, C.P.; LIMBERGER, I.I.; DA SILVA, R.C.F.; ANTOCHEVIS, L.C.; VIEIRA, F.J.; RIBEIRO, V.B.; MAGAGNIN, C.N.; ROZALES, F.P.; FALCI, D.R. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. *Clinical & Biomedical Research*, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2014.

PINTO, T.C.A.; COSTA, N.S.; CASTRO, L.F.S.; RIBEIRO, R.L.; BOTELHOS, A.C.N.; NEVES, F.P.G.; PERALTA, J.M.; TEIXEIRA, L.M. Potential of MALDI-TOF MS as an alternative approach for capsular typing *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Nature*, Brasil, v. 7, p. 45572, mar. 2017.

PRADO, G.; MENDES, E.T.; MARTINS, R.C.R.; PERDIGÃO-NETO, L.V.; FREIRE, M.P.; MARCHI, A.P.; CÔRTEZ, M.F.; LIMA, V.A.C.C.; ROSSI, F.; GUIMARÃES, T.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 59, n. 1, p. 106463, jan. 2022.

RAMOS, J.N. Caracterização de estirpes sugestivas de Corinebactérias isoladas de sítios intravenosos. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - INCQS/Fiocruz. Rio de Janeiro, p. 114. 2014.

RANGBERG, A.; LARSEN, A.L.; KACELNIK, O.; SAETHER, H.S.; BIORLAND, M.; RINGSTAD, J.; JONASSEN, C.M. Molecular analysis and epidemiological typing of vancomycin resistant *Enterococcus* outbreak strains. *Scientific Reports*, v.9, n. 11917, ago. 2019.

REGEV-YOCHAY, G; SMOLLAN, G; TAL, I; ZADE, N.P; HAVIV, Y; NUDELMAN, V; GAL-MOR, O; JABER, H; ZIMLICHMAN, E; KELLER, N; RAHAV, G. Sink traps as the source of transmission of OXA-48-producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, Israel, v. 39, p. 1307-1315, 2018.

RIVERA-IZQUIERDO, M.; LÁINEZ-RAMOS-BOSSINI, A.J.; RIVERA-IZQUIERDO, C.; LÓPEZ-GÓMEZ, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, N.F.; REDRUELLO-GUERRERO, P.; MARTÍN-DELOSREYES, L.M.; MARTÍNEZ-RUIZ, V.; MORENO-ROLDÁN, E.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, E. OXA-48 Carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Spanish hospitals: An updated comprehensive review on a rising antimicrobial resistance. *Antibiotics*, Espanha, v. 10, n. 1, p. 89, jan. 2021.

ROCCA, M.F.; PRIETO, M.; ALMUZARA, M.; BARBERIS, C.; VAY, C.; Viñes MP (ed). Guide for the interpretation of MALDI-TOF (Bruker Daltonics) results: Alternatives for microorganism identification. 2da. ed. Buenos Aires: ANLIS; UBA, 2020.

RÖDEL, J; MELLMANN, A; STEIN, C; ALEX, M; KIPP, F; EDEL, B; DAWCZYNSKI, K; BRANDT, C; SEIDELS, L; PFISTER, W; LÖFFLER, B; STRAUBE, E. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases*, Alemanha, v. 38, n. 3, p. 581-591, mar. 2019.

RODRIGUES, A.P.F. Eficácia e segurança de polimixinas no tratamento de infecções por microrganismos produtores de carbapenemase: revisão de literatura. 2016. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

RODRIGUES, D. Impacto da concentração inibitória mínima de amicacina no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. 2020. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

RODRIGUES, F.C.B; DE MESQUITA, A.R.C. Enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas de transplantados renais: frequência e perfil de resistência. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Brasil, fev. 2016.

ROSETO, N.S.; CORRAL, Y.T.; ÁLVAREZ, C.F.; GUIRAO, A.A.; PRADO, R.S.; SANTOS, Y. Usefulness of matrix assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry for the identification of *Streptococcus mutans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 104, p. 10601-10612, nov. 2020.

- SADEK, M.; DE LA ROSA, J.M.O.; RAMADAN, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Molecular characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers, carbapenemase producers, polymyxin resistant, and fosfomycin resistant *Enterobacterales* among pigs from Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. S2213-7165, n. 22, p. 128, jun. 2022.
- SALDANHA, D.M.S.; DE SOUZA, M.B.M.; RIBEIRO, J.F. O uso indiscriminado dos antibióticos: Uma abordagem narrativa da literatura. *Revista Interfaces da Saúde*, Fortaleza, CE, v. 5, n. 1, p. 12-37, jun. 2018.
- SANDNER-MIRANDA, L.; VINUESA, P.; CRAVIOTO, A.; MORALES-ESPINOSA, R. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*, México, v. 9, maio 2018.
- SANTOS, M.C.; RIBEIRO, M. Bactérias de relevância clínica e seus mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). *Revista Científica UMC*, Mogi das Cruzes, SP, v. 1, n. 1, p. 45-56, ago. 2016.
- SAUGET, M.; VALOT, B.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends in Microbiology*, v. 25, n. 5, p. 447-455, jun. 2017.
- SAUGET, M., VAN DER MEE-MARQUET, N., BERTRAND, X. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *Journal of Microbiological Methods*, França, v. 127, p. 20-23, ago. 2016.
- SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current trends. *Current Issues in Molecular Biology*, Alemanha, v. 23, p. 17-20, maio 2017.
- SILVA, D.S.A. Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores e sua participação em processo de biorremediação de lodo de esgoto: provas bioquímicas convencionais, VITEK®-2, MALDI-TOF e sequenciamento genético. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas/ Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, p. 292. 2020.
- SILVA, K.E.; CAYÔ, R.; CARVALHAES, C.G.; SACCHI, F.P.C.; RODRIGUES-COSTA, F.; DA SILVA, A.C.R.; CRODA, J.; GALES, A.C.; SIMIONATTO, S. 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, jul. 2015.
- SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K.; VIRDI, J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, Índia, v. 6, ago. 2015.
- SOLGI, H.; NEMATZADEH, S.; GISKE, C.G.; BADMASTI, F.; WESTERLUND, F.; LIN, Y.L.; GOYAL, G.; NIKBIN, V. S.; NEMATI, A.H.; SHAHCHERAGHI, F. Molecular epidemiology of OXA-48 and NDM-1 producing *Enterobacterales* species at a University Hospital in Tehran, Iran, between 2015 and 2016. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 936, mai. 2020.

STEENSELS, D; DEPLANO, A; DENIS, O; SIMON, A; VERROKEN, A. MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Acta Clinica Belgica*, Bélgica, v. 72, n. 4, p. 219-225, ago. 2017.

SUZUKI, Y.; NAZARENO, P.J.; NAKANO, R.; MONDOY, M.; NAKANO, A.; BUGAYOUNG, M.P.; BILAR, J.; PEREZ, M.V.; MEDINA, E.J.; SAITO-OBATA, M.; SAITO, M.; NAKASHIMA, K.; OSHITANI, H.; YANO, H. Environmental presence and genetic characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from hospital sewage and river water in the Philippines. *Applied and Environmental Microbiology*, Filipinas, v. 86, n. 2, jan. 2020.

TILAHUN, M.; KASSA, Y.; GEDEFIE, A.; ASHAGIRE, M. Emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection, its epidemiology and novel treatment options: a review. *Infection and Drug Resistance*, v. 14, p. 4363-4374, out. 2021.

TILANUS, A.; RINCON, F.M.; RIVERA, A.M. Native mitral valve endocarditis associated with KPC producing *Serratia marcescens* bacteremia successfully treated with mitral valve replacement and ceftazidime-avibactam. *IDCases*, v. 24, abr. 2021.

TOBA, S; MINATO, Y; KONDO, Y; HOSHIKAWA, K; MINAGAWA, S; KOMAKI, S; KUMAGAI, T; MATOBA, Y; MORITA, D; OGAWA, W; GOTOH, N; TSUCHIYA, T; KURODA, T. Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from *Serratia marcescens*, Db10. *Scientific Reports*, Japão, v. 9, p. 4854, mar. 2019.

UHLIK, O.; STREJCEK, M.; JUNKOVA, P.; SANDA, M.; HROUDOVA, M.; VLCEK, C.; MACKOVA, M.; MACEK, T. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDI biotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 77 n. 19 p. 6858–6866. oct. 2011.

VÁZQUEZ-UCHA, J.C.; ARCA-SUÁREZ, J.; BOU, G.; BECEIRO, A. New carbapenemase inhibitors: Clearing the way for the  $\beta$ -lactams. *International Journal of Molecular Sciences*, Espanha, v. 21, n. 23, p. 9308, dez. 2020.

VIANNA, E.F. Identificação das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística: comparação entre as técnicas de Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry e o sequenciamento do gene recA. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

VIEGAS, D.M.; SOARES, V.M. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 54, n. 2, mar/abr. 2018.

VILA, J; GÓMEZ, M.D; SALAVERT, M; BOSCH, J. Métodos de diagnóstico rápido em microbiologia clínica: necesidades clínicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Espanha, v. 35, n. 1, p. 41-46, dez. 2016.

WALLET, F.; LOÏEZ, C.; RENAUX, E.; LEMAITRE, N.; COURCOL, R.J. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, França, v. 43, n. 9, p. 4402-4406, set. 2005.

WEIN, T.; HÜLTER, N.F.; MIZRAHI, I.; DAGAN, T. Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nature Communications*, v. 10, n. 2595, jun. 2019.

WEIN, T.; WANG, Y.; HÜLTER, N.F.; HAMMERSCHMIDT, K.; DAGAN, T. Antibiotics interfere with the evolution of plasmid stability. *Current Biology*, v. 30, n. 19, p. 3841-3847, out. 2020.

WHEAT, R.P.; ZUCKERMAN, A.; RANTZ, L.A. Infection due to *chromobacteria*; report of 11 cases. *AMA Archives of Internal Medicine*, v. 88, n. 4, p. 461-6, out. 1951.

WILSON, H.; TOROK, M.E. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, Cambridge, UK, v. 4, n. 7, jul. 2018.

WINK, P.L.; MARTINS, A.S.; VOLPATO, F.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Increased frequency of blaNDM in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 299-301, mar. 2021.

YANG, H.; CHENG, J.; HU, L.; ZHU, Y.; LI, J. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 21, p. 4427-4437, jun. 2012.

ZAGONEL, J.T.; ZAGONEL, E. F.; OGLIARI, N. F. Resistência bacteriana a antibióticos. *Ciência se Faz com Pesquisa!* Campina Grande: Realize Editora, 2021.

ZBINDEN, R.; BLASS, R. *Serratia plymuthica* osteomyelitis following a motorcycle accident. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, n. 7, p. 1409-10, jul. 1998.