

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz

**Caracterização de isolados de *Serratia marcescens*
Por *Whole-Genome Sequencing***

CUIABÁ-MT
2024

Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz

**Caracterização de isolados de *Serratia marcescens*
Por *Whole-Genome Sequencing***

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Dutra

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ-MT

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

C957c Cruz, Thalita Priscila Peres Seabra da.
Caracterização de isolados de *Serratia marcescens* Por Whole-Genome Sequencing [recurso eletrônico] / Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 75 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Valéria Dutra.
Coorientador: Luciano Nakazato.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.
Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.
Inclui bibliografia.

1. *Serratia marcescens*. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. Sequenciamento genômico. I. Dutra, Valéria, *orientador*. II. Nakazato, Luciano, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização de isolados de *Serratia marcescens* por Whole-Genome Sequencing.

AUTORA: Doutoranda Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz

Tese defendida e aprovada em 13 de maio de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutora Valéria Dutra (Presidente Banca/Orientadora)
2. Doutora Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva (Examinadora Externa)
3. Doutora Fernanda Harumi Maruyama (Examinadora Externa)
4. Doutor Kledir Anderson Hofstaetter Spohr (Examinador Interno)
5. Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida (Examinadora Interna)
6. Doutora Cristiane Silva Chitarra (Examinadora Suplente)

Cuiabá, 13 de maio de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA DUTRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 12/07/2024, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva, Usuário Externo**, em 15/07/2024, às 23:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 16/07/2024, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Diretor(a) Geral do Hospital Veterinário - FAVET/HOVET/UFMT**, em 16/07/2024, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Harumi Maruyama**, **Usuário Externo**, em 16/07/2024, às 19:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6968403** e o código CRC **76E9294E**.

Referência: Processo nº 23108.029743/2024-44

SEI nº 6968403

*Dedico este trabalho às minhas lindas obras extracurriculares
do Doutorado: Minhas pequenas Mírian e Marina.*

*Dedico também ao papai Felipe Seabra da Cruz, que
nunca mediu esforços para tornar essa
minha dupla jornada mais leve.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar encaminhando todas as coisas para que o sonho de ser Doutora COM Doutorado fosse realizado e a minha família que também se orgulha muito deste título.

Aos meus orientadores Valéria Dutra (minha super-heroína) e Luciano Nakazato que são verdadeiros exemplos de profissionais. Agradeço por me aceitarem mesmo sendo de outra área e por serem sempre tão solícitos e dispostos a me ensinar tudo que fosse preciso. A todos os colegas e amigos que fiz nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular por todo carinho, ajuda e aprendizagem.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso (PPGVET-UFMT). A todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa grande conquista, o meu muito obrigada!

RESUMO

A resistência antimicrobiana originada a partir das infecções nosocomiais ocupam a quarta maior causa de óbitos no Brasil e até 2050 o número de mortes por ano pode chegar a 10 milhões em todo o mundo. O uso intensivo e indevido dos antimicrobianos resulta no surgimento de resistência em vários patógenos, reduzindo as possibilidades para o tratamento de infecções, especialmente entre agentes nosocomiais de importância clínica. *Serratia marcescens* vem se apresentando de forma notória por sua crescente resistência antimicrobiana e potencial para causar surtos em ambientes hospitalares. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a presença de genes de resistência e fatores de virulência em *S. marcescens* causadores de um surto em um hospital terciário em Cuiabá-Mato Grosso, Brasil, por meio do teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior sequenciamento completo do genoma (*Whole Genome Sequencing* - WGS) para a caracterização de amostras clonais e confirmação do surto. O perfil fenotípico evidenciou amostras resistentes a múltiplas drogas (MDR), sensíveis apenas à duas classes antimicrobianas das dez testadas. Genotipicamente, os resultados indicaram uma variedade de fatores de virulência e resistência, demonstrando a diversidade de contextos genéticos em que esses genes podem estar inseridos. O sequenciamento identificou mais de 20 genes de resistência e virulência como Carbapenemases, β -lactamases, enzimas que hidrolizam aminoglicosídeos e bombas de efluxo, detectadas em todas as amostras. Devido a similaridade genotípica e aos dados obtidos no WGS, constatou-se que os dez isolados de *S. marcescens* são clonais, confirmando o surto.

Palavras-chave: *Serratia marcescens*; resistência a antimicrobianos, sequenciamento genômico.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance originating from nosocomial infections ranks as the fourth leading cause of death in Brazil, and by 2050, the annual death toll worldwide could reach 10 million. The intensive and inappropriate use of antimicrobials leads to the emergence of resistance in various pathogens, reducing treatment options for infections, especially among clinically significant nosocomial agents. *Serratia marcescens* has become notably known for its increasing antimicrobial resistance and potential to cause outbreaks in hospital settings. The aim of this study was to establish the presence of resistance genes and virulence factors in *S. marcescens* strains causing an outbreak in a tertiary hospital in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, through *Polymerase Chain Reaction* (PCR) testing and subsequent *Whole Genome Sequencing* (WGS) for the characterization of clonal samples and outbreak confirmation. Phenotypically, the samples showed resistance to multiple drugs (MDR), being sensitive to only two antimicrobial classes out of the ten tested. Genotypically, the results indicated a variety of virulence and resistance factors, demonstrating the diversity of genetic contexts in which these genes may be inserted. Sequencing identified over 20 resistance and virulence genes such as Carbapenemases, β -lactamases, aminoglycoside-hydrolyzing enzymes, and efflux pumps, detected in all samples. Due to the genotypic similarity and data obtained from WGS, it was found that the ten isolates of *S. marcescens* are clonal, confirming the outbreak.

Keywords: *Serratia marcescens*; antimicrobial resistance, genomic sequencing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados na reação em cadeia de polimerase para detecção de genes de resistência, tamanho molecular do produto amplificado e sua respectiva referência bibliográfica.....	34
Tabela 2. Dados dos pacientes e perfil de resistência aos antibióticos.	37
Tabela 3. Características genômicas de surto de <i>Serratia marcescens</i> clonal MDR em pacientes de UTI, Cuiabá-MT, Brasil.....	38
Tabela 4. Genes de virulência e resistência sequenciados nas dez amostras de <i>Serratia marcescens</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

μl - Microlitro

μg - Micrograma

ng - Nanograma

AAC(6') - Enzima Aminoglicosídeo N(6')-acetiltransferase

AMI – Amicacina

ampC - Cefalosporinase

*bla*_{IMP} - Imipenemase

*bla*_{KPC} - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

*bla*_{OXA} - Oxacilinase

*bla*_{SRT} - *Serratia marcescens* Beta-lactamase

*bla*_{TEM} - Beta-lactamase

*bla*_{VIM} - Verona imipenemase

CDS – Região de codificação (*Coding DNA sequence*)

CIM - Concentração inibitória mínima

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - *Clinical and Laboratorial Standards Institute*

CPM - Cefepime

CRE - *Enterobacteriaceae* carbapenem-resistentes

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EIRP - Enterobactérias Intrinsecamente Resistentes a Polimixina

ESBL - β-Lactamase de Espectro Estendido

ETP - Ertapenem

GEN - Gentamicina

HUJM - Hospital Universitário Júlio Müller

IMP – Imipenem

IACG - Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*

MBL – Metallo-β-Lactamase

MDR – Multidrug-resistant: Resistência a múltiplas drogas

MER – Meropenem

OMS - Organização Mundial

da Saúde ONU – Organização

das Nações Unidas PCR -

Reação em cadeia pela

polimerase

PDR - Pandrug-resistant: Resistência a todos os antimicrobianos

testados POL - Polimixina B

PPT - Piperaciclina +

tazobactam RND -

Resistance-Nodulation-

Division rRNA - Ácido

Ribonucleico Ribossomal

SPM - São Paulo metallo-

β -lactamase TG -

Tigeciclina

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

UTIN - Unidades de Tratamento Intensivos

Neonatais WGS - *Whole-Genome*

Sequencing

XDR - Extensively drug-resistant: Sensibilidade a apenas duas classe

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Saúde Única (<i>One Health</i>)	16
2.2	Família <i>Enterobacteriaceae</i>	17
2.3	<i>Serratia</i> sp.	18
2.3.1	<i>Serratia marcescens</i>	19
2.3.2	<i>Serratia marcescens</i> na Medicina Veterinária	20
2.4	Genes de Resistência a Antimicrobianos	21
2.4.1	Gene <i>bla</i> _{KPC}	22
2.4.2	Gene <i>bla</i> _{OXA}	23
2.4.3	Gene <i>bla</i> _{SRT}	23
2.4.4	Gene <i>bla</i> _{TEM}	24
2.4.5	Gene <i>AAC(6')</i>	24
2.5	Fatores de Virulência	25
2.5.1	Proteína <i>oqxB</i>	25
2.5.2	Proteína <i>H-NS</i>	26
2.5.3	Proteína <i>mexI</i>	26
2.5.4	Proteínas <i>sdeB</i> / <i>sdeX</i> / <i>sdeY</i>	26
2.5.5	Proteína <i>CpxAR</i>	26
2.5.6	Proteína <i>CRP</i>	26
2.5.7	Proteína <i>acrB</i>	27
2.5.8	Proteína <i>cadA</i>	27
2.5.9	Proteína <i>rpoS</i>	27
2.5.10	Proteína <i>rcsB</i>	27
2.5.11	Proteína <i>cheY</i>	28
2.5.12	Proteínas <i>fliG</i> / <i>fliM</i>	28
2.5.12	Proteína <i>GndA</i>	28
2.5.13	Lipoproteína <i>ECS88_3547</i>	29
2.5.14	Transposon <i>tnpR</i>	29
2.5.15	Integron <i>intl</i>	29
2.6	Sequenciamento do Genoma Completo - SGC (<i>Whole-genome Sequencing</i> - WGS) ..	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2.	Objetivos específicos	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Aprovações e declarações ética	32
4.2	Local de estudo e isolados	32
4.3	Dados clínicos dos pacientes	32
4.4	Identificação	32
4.5	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	33
4.6	Extração de DNA	33
4.7	PCR para detecção dos genes de resistência e fatores de virulência	33
4.8	Sequenciamento dos Genes	34
4.9	<i>Whole-genome Sequencing</i> (WGS)	34
4.10	Análise Bioinformática	35
5	RESULTADOS	36
ARTIGO 1		39
ARTIGO 2		48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7	CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS		56
8.	ANEXO	71

1. INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais ocupam a quarta maior causa de óbitos no Brasil e é considerado um grave problema médico-social, que resulta em significativa morbidade e mortalidade (SILVA & LINCOPAN, 2012; LIANG et al., 2017). Segundo o relatório anual da Organização das Nações Unidas, doenças causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos causam cerca de 700.000 mortes por ano em todo o mundo, podendo chegar a 10 milhões por ano até de 2050 (O'NEILL, 2016; IACG, 2019). O uso abusivo de antimicrobianos em animais e humanos, bem como a eliminação incorreta dos medicamentos e tratamento inadequado de esgoto, são alguns dos vários fatores que contribuem com o aumento da resistência antimicrobiana e favorecimento da transmissão dessa resistência entre os microrganismos (SUBRAMANIAM & GIRISH, 2020).

Devido a este crescente nível de resistência a antimicrobianos nos últimos anos, todos os campos da saúde se uniram em 2019 para criar uma abordagem de Saúde Única (*One Health*), visto que já se reconhece que humanos, animais e meio ambiente estão interconectados. Tais medidas consistem na implementação de programas e políticas voltadas para a prevenção e controle da disseminação de resistência bacteriana (IACG, 2019).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos é um problema de grande importância mundial, especialmente entre agentes nosocomiais de importância clínica como os bacilos Gram negativos membros da família Enterobacteriaceae (BERTONCHELI & HORNER, 2008; SMOLDERS et al., 2019; TRACY et al., 2020). Dentre eles a *Serratia* sp, considerada importante contaminante do solo, água e vegetais, vista por muito tempo como uma bactéria ambiental não-patogênica e que possuía como *habitat* primário o intestino do homem e demais animais vertebrados (KONEMAN et al., 2008), nos últimos anos tem sido descrita como um patógeno oportunista geralmente associada a infecções nosocomiais, sendo isolado a partir de uma variedade de fontes, incluindo dispositivos médicos contaminados, soluções intravenosas e tópicas, sabonetes líquidos e ar condicionado (POLILLI et al., 2011; GUPTA et al., 2014; VETTER et al., 2016; FRUTOS et al., 2017). Relata-se a associação deste agente a casos de meningite, sepse, infecções do trato urinário, da pele, das vias respiratórias e oculares (ENGELHART et al., 2003; SHANKS et al., 2013; WU et al., 2013; GUPTA et al., 2014). Persiste por longos períodos no ambiente hospitalar, onde geralmente causa surtos, especialmente em Unidades de Tratamento Intensivos

Neonatais (UTIN) (CASOLARI et al., 2013; DAWCZYNSKI et al., 2016).

Destaca-se por apresentar elevado nível de resistência intrínseca e adquirida a uma variedade de classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, quinolonas, macrolídeos e polipeptídeos (SANDNER-MIRANDA et al., 2016). O uso intensivo e indevido de tais medicamentos resulta no surgimento de resistência em vários patógenos, reduzindo as possibilidades para o tratamento de infecções (OMOREGIE et al., 2010).

A resistência intrínseca é conferida por genes de resistência a antibióticos, incluindo genes associados a bombas de efluxo que estão presentes no cromossomo e são compartilhados por membros da mesma espécie ou gênero. A resistência adquirida é conferida pelos ganhos de novos genes de resistência via transferência gênica horizontal que estão localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons, transposons ou ilhas genômicas (BLAIR et al., 2014 ; HU et al., 2015), e pode ser definido como qualquer segmento de DNA que pode translocar de uma parte do genoma para outra ou, entre genomas (VAN HOEK et al., 2011). Esta transferência de genes de resistência aos microrganismos sensíveis vem sendo relatada há décadas (WALTHER-RASMUSSEN & HOIBY, 2007, PITOUT et al., 2015).

O principal mecanismo de resistência das enterobactérias é a produção de β -lactamases, enzimas que agem hidrolisando o anel β -lactâmico e impedindo a ação desta classe de antibióticos (BERTONCHELI & HORNER, 2008). As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) possuem mecanismos de patogenicidade que se destaca entre as enzimas produzidas por enterobactérias (BUSH & JACOB, 2010).

Uma das dificuldades no tratamento de infecções causadas por bactérias portadoras de genes de resistência e fatores de virulência é que, em determinados casos, não há resistência plena ao antibiótico, tornando a detecção molecular desses genes obrigatória para assegurar o sucesso terapêutico, especialmente em situações de resultados que demonstrem falsa sensibilidade (DEL PELOSO et al., 2010).

Considerando a necessidade de pesquisar e confirmar a ocorrência de surtos, objetivamos realizar o sequenciamento do genoma completo (Whole-genome sequencing-WGS) dos isolados de *S. marcescens* provenientes de um hospital terciário em Cuiabá- Mato Grosso, Brasil, a fim de estabelecer a confirmação da suspeita de surto com significativa taxa de mortalidade (40%) bem como a presença de genes de resistência e fatores de virulência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Saúde Única (One Health)

Nos últimos anos, temos observado uma diversidade de bactérias resistentes a antimicrobianos, que vêm causando graves consequências clínicas e econômicas através do aumento da morbidade e mortalidade na população humana e animal (ROSSOLINI et al. 2014; VAN DUIN & DOI, 2015; SERWECIŃSKA, 2020). Essas bactérias foram classificadas na última década em três categorias: Multirresistentes (MDR): definidas como resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos; Extensivamente Resistentes (XDR): definidas como resistentes a todas as classes selecionadas, exceto duas; e Pan-Resistentes (PDR): definidas como resistentes a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (PATERSON & DOI, 2007; MAGIORAKOS et al., 2012). O aumento da população humana, de animais domésticos e animais de produção associada a intensificação do desmatamento e a destruição dos *habitats* dos animais silvestres e consequentemente declínio desta população, juntamente aos danos ambientais generalizados, são fatores que resultaram no aumento da ocorrência de microrganismos resistentes e doenças emergentes e reemergentes, (RABINOWITZ et al., 2013). Este crescente nível de resistência aos antimicrobianos vem se tornando uma grande preocupação mundial em todos os campos da saúde nos últimos anos (WHO, 2014). Desta forma, a Organização das Nações Unidas (ONU) fez um alerta no ano de 2019, criando uma abordagem de Saúde Única (*One Health*) a fim de controlar a disseminação e a resistência bacteriana seja ela em humanos, animais ou meio ambiente (IACG, 2019).

Os elementos desta tríade apresentam-se totalmente interconectados, podendo transmitir patógenos entre si (humanos e animais), ou como fonte de microrganismos resistentes (plantas e alimentos) (IACG, 2019). Assim, para se alcançar uma Saúde Única bem-sucedida, sua abordagem deve ser feita de forma transdisciplinar integrando não apenas a tríade humanos, animais e ambiente, mas também a medicina preventiva, a vigilância ativa, a transferência de conhecimento e os múltiplos esforços colaborativos transdisciplinares (OMS, 2020).

2.2 Família Enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao filo *Proteobactéria*; classe *Gammaproteobacteria*; ordem *Enterobacteriales*, composta por mais de 51 gêneros e 279 espécies de bactérias descritas, amplamente distribuídas na natureza (solo, água, vegetais e trato intestinal de seres humanos e animais vertebrados). Os membros dessa família são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, flagelados ou imóveis, catalase positiva e oxidase negativa, capazes de fermentar glicose e reduzir nitrato (KONEMAN et al. 2001; MURRAY et al., 2009). Os gêneros e espécies dessa família de maior importância clínica são: *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., os quais podem ser isolados de amostras biológicas como sangue, urina, secreções do trato respiratório, placenta e feridas (ANVISA, 2017; ZHANG et al. 2018; DING et al. 2019; KUMUDUNIE et al. 2020; FRANK et al., 2021), principalmente em pacientes imunocomprometidos, debilitados e/ou submetidos a procedimentos invasivos (ADEDIRAN et al. 2020).

Quatro mecanismos fundamentais são os responsáveis pela aquisição da resistência a diferentes classes de antimicrobianos nos membros da família *Enterobacteriaceae*: alteração na permeabilidade da membrana bacteriana; mutações na proteína-alvo do antimicrobiano; produção de enzimas capazes de degradar os antibióticos e mecanismos de efluxo das substâncias (BARTH et al., 2013). O tratamento da maioria das infecções causadas por enterobactérias consiste na utilização de antibióticos β -lactâmicos. Entretanto, ao surgirem bactérias resistentes à múltiplas drogas (MDR), em especial das *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e *Enterobacteriaceae* carbapenem-resistentes (CRE), a utilidade terapêutica dos antibióticos β -lactâmicos para as infecções causadas por estes microrganismos vem se tornando cada vez mais limitada (MORRIL et al. 2015). Dentre as β -lactamases, as carbapenemases se destacam por hidrolisarem carbapenêmicos, uma das mais potentes e relevantes classe antimicrobiana em enterobactérias (NODARI, 2016).

Desta forma, as enterobactérias são consideradas importantes quanto a transmissão e resistência bacteriana, tanto pela facilidade de disseminação entre indivíduos como pela propensão de adquirir material genético via transferência horizontal de genes, mediada principalmente por plasmídeos e *transposons* (CUZON et al. 2011).

2.3 *Serratia* sp.

Serratia foi originalmente descrita na Itália no início do século 19, após a observação de uma pigmentação avermelhada semelhante a sangue aparecendo na polenta e posteriormente em outros alimentos (MERLINO, 1924). Este gênero inclui diversos membros ambientais diversos e clinicamente importantes. Entretanto, mesmo sendo estudado há mais de um século, há uma escassez de informações genômicas em todo o gênero e uma estrutura filogenética robusta baseada em todo o genoma (WILLIAMS et al., 2022). Apresentam características microbiológicas como anaerobiose facultativa, não esporulantes, presença de flagelo e capacidade de mobilidade, elevado potencial de aderência e formação de biofilme e pigmentação vermelha causada pela prodigiosina; catalase positiva, oxidase negativa e geralmente capacidade de reduzir nitrato em nitrito (MURRAY et al. 2009; BAKKIYARAJ et al., 2012).

São conhecidas 10 espécies desse mesmo gênero: *S. rubidaea* e *S. liquefaciens*, que também foram relatados como causadores de infecções hospitalares, embora com menor frequência (MAHLEN 2011; KARKEY, et al. 2018); *S. entomophila* e *S. Proteamaculans* que apresentam-se principalmente como patógenos associados a insetos (RODRÍGUEZ-SEGURA et al., 2012; HURST et al., 2018); *S. ficaria* que está associada ao ciclo de polinização de figos e oviposição de vespas do figo (GRIMONT et al., 1979). As espécies de *Serratia* podem ser encontradas em diversos nichos ambientais incluindo o isolamento frequente de ambientes aquosos como no caso de *S. Plymuthica* e *S. Fonticola*. Existem ainda *S. grimesii*, já isolada em pequenos mamíferos (WILLIAMS et al., 2022), *S. odorifera*, a qual produz odor similar ao de batatas com casca, que já foram descritas como causadoras de infecção urinária (MENEZES et al., 2004), e *S. marcescens*, a mais frequentemente isolada (BAKKIYARAJ, et al., 2012; WILLIAMS et al., 2022).

Serratia marcescens (*S. marcescens*) serviu como um sistema modelo para estudar as principais características bacterianas, incluindo sistemas de secreção de proteínas (MURDOCH et al., 2011) e motilidade (WILLIAMSON et al., 2008), mas também representa um importante patógeno humano oportunista (MAHLEN, 2011; KHANNA et al., 2013) para o qual houve um significativo aumento na incidência de multirresistência aos medicamentos e casos relatados de infecções hospitalares graves (MORADIGARAVAND et al., 2018).

Segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares do

Estado de São Paulo, *Serratia* é o sétimo Gram-negativo mais isolado em hemoculturas, representando 2,31% do total nas UTIs de adultos e 4% nas UTIs pediátricas (CVE, 2017). Nos casos de surtos em unidades de cuidado neonatal, o cenário é diferente, sendo o terceiro agente mais prevalente de 48 relatos de surtos em UTIs neonatais da Alemanha (GASTMEIER, 2014).

As *Serratias* são geralmente sensíveis às classes antimicrobianas: aminoglicosídeos, cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos, e às associações de sulfametoxazol-trimetropim, piperacilina-tazobactam e ticarcilina-clavulonato. Prescrever betalactâmicos para tratamento por longos períodos, requer uma avaliação rigorosa, devido à presença de AmpC cromossomal e risco de perda da sensibilidade ao antimicrobiano (exceto aos carbapenêmicos). A maioria das espécies de *Serratia* é intrinsecamente resistente a penicilina, macrolídeos, clindamicina, glicopeptídeos e rifampicina. Algumas delas, como a *S. marcescens*, são também frequentemente resistentes a ampicilina, amoxicilina-clavulonato, ampicilina-sulbactam, cefuroxima, nitrofurantoína, tetraciclina e polimixina (PETERSEN & TISA, 2013). Pela resistência à polimixina, ela entra no grupo das chamadas enterobactérias intrinsecamente resistentes a polimixina (EIRP) juntamente com *Providencia* spp., *Neisseria* spp., *Proteus* spp e *Burkholderia cepacia* (MELO, 2019).

2.3.1 *Serratia marcescens*

S. marcescens é um agente causador de infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonia, meningite, infecções do trato urinário, endocardite, conjuntivite e infecções de sítio cirúrgico. Nos hospitais, essas espécies sobrevivem e crescem em ambientes úmidos (VETTER et al., 2016). Diferentes fontes ambientais para *S. marcescens* foram descritos como focos de infecção, incluindo contaminação de dispositivos médicos, soluções intravenosas e tópicas, sabonete líquido e ar condicionado (FRUTOS et al., 2017; GUPTA et al., 2014; POLILLI et al., 2011; VETTER et al., 2016).

Essas bactérias, geralmente, são relatadas como uma causa de surtos, especialmente em unidades de tratamento intensivos neonatais (UTIN) (CASOLARI et al., 2013; DAWCZYNSKI et al., 2016), uma vez que prematuros tem um risco particularmente elevado de sepse causada por *S. marcescens* (BARTELS et al., 2007). Procedimentos invasivos, administração de antibióticos e fatores de risco relacionados ao paciente, como baixo peso ao nascer, baixa idade gestacional e imaturidade, são fatores de risco bem

conhecidos para infecções graves por esta bactéria (POLILLI et al., 2011). Há 14 anos, Anderson et al. (2008) já observavam uma taxa significativamente maior (17%) de infecção em pacientes de UTIN colonizados por *S. marcescens* quando em comparação a crianças colonizadas com outros patógenos, como *Enterobacter cloacae* (2,4%) ou *Klebsiella pneumoniae* (3,7%). Um estudo um pouco mais recente realizado no Brasil, indicou como principais fontes de disseminação associadas a surtos por *S. marcescens* são o aparelho digestivo, respiratório, urinário, períneo de recém-nascidos e as unhas de adultos e trabalhadores da área de saúde (LIMA et al., 2011). Além de descrita entre os patógenos que ameaçam a saúde categorizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prioridades de pesquisa para desenvolver estratégias antimicrobianas alternativas, *S. marcescens* foi também recentemente identificada como um dos principais componentes do microbioma intestinal na disbiose familiar da doença de Crohn (LAZZARO et al., 2017).

Os fatores de virulência que conduzem à infecções causadas por *S. marcescens* não são totalmente compreendidos, mas os principais contribuintes incluem: proteases, exotoxinas e a formação de biofilme (FOURNIER et al., 2016). Quanto à resistência, os plasmídeos de amplo espectro são comumente identificados e podem estar relacionados à aquisição de genes de resistência pela *S. marcescens* (MELO, 2019).

2.3.2 *Serratia marcescens* na Medicina Veterinária

Relatada em cães há mais de 60 anos por infecções experimentais (KUNSTÝŘ & POSPÍŠIL, 1962) e naturais (WILKINS, 1973), causando sepse e óbito, *S. marcescens* possui também um alto potencial zoonótico. Assim como em hospitais humanos, é uma potencial causa de surtos hospitalares veterinários. Fox et al. (1981) relataram o isolamento de *S. marcescens* em 50% de todos os cateteres intravenosos contaminantes de cães e gatos em um grande Hospital Veterinário em Boston - Massachusetts, sendo também isolada do trato respiratório, geniturinário, pele e outros locais em animais hospitalizados. Dos 11 isolados de *S. marcescens*, cinco foram oriundos de cateteres intravenosos, 6 de potes de esponja aquosa de cloreto de benzalcônio aquoso (0,025%) localizados na unidade de terapia intensiva, salas de cirurgia e ambulatórios do hospital, sendo esta última considerada como fonte primária de *S. marcescens*, o que demonstra que o uso inadequado de desinfetantes desempenha um papel importante na transmissão nosocomial de *S. marcescens*. Todos os isolados foram testados para suscetibilidades a antibióticos e apresentaram-se MDR (estreptomicina, cefalotina e ampicilina). Sepse por *S. marcescens*

em outras espécies já foram também relatadas como em equinos adultos (YOUNG et al. 1989); potro neonato (SHAFTOE, 1984), aves (canários e cracídeos), nas quais essa bactéria apresentou-se como fonte de infecção ou apenas microbiota intestinal, porém, sempre com alto nível de resistência (KAIRALA et al., 2021; SANTOS et al., 2010).

Outras espécies de *Serratia* também podem acometer animais. Um estudo recentemente publicado relatou o desenvolvimento de osteossarcoma condroblástico em um pastor alemão, de 15 meses de idade, quando ocorreu uma transformação maligna secundária ao histórico de osteomielite crônica causada por *Serratia liquefaciens*, uma complicação rara e tardia em humanos e animais, sendo este o primeiro relato de osteomielite causada por *S. liquefaciens* em cães (FRANCHINI et al., 2022).

Com a crescente relação entre crise ecológica e aumento de episódios de transbordamento zoonótico – termo que se refere a episódios de transferência de patógenos como vírus, bactérias, protozoários e etc., que comumente infectam ou vivem em espécies não humanas para a nossa (SILVA et al., 2021) – torna-se essencial considerar a condição de transmissão de tais agentes à população humana.

2.4 Genes de Resistência a Antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um desafio na saúde pública, levando a graves consequências clínicas e econômicas, bem como o aumento da morbidade e mortalidade de pessoas e animais (ROSSOLINI et al., 2014; SERWECIŃSKA, 2020; TZOUVELEKIS et al., 2012; VAN DUIN & DOI, 2015).

Os fatores envolvidos na disseminação de patógenos multirresistentes na medicina incluem o uso indiscriminado de antimicrobianos, automedicação com escolhas e dosagens inadequadas e exposição a infecções em hospitais (PRESTINACI et al., 2015). Durante anos, antibióticos β -lactâmicos foram utilizados com sucesso e eram considerados a base do tratamento para a maioria das infecções graves causadas por bactérias gram-negativas. Porém, o número de antibióticos disponíveis para tratamentos vêm diminuindo, bem como a eficácia destes, principalmente pela aquisição generalizada de genes que codificam enzimas, como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases, que medeiam a resistência a diversos antimicrobianos (MORRILL et al., 2015; TACCONELLI et al., 2018).

O mecanismo de resistência mais comumente utilizado pelas bactérias Gram-negativas de importância clínica é a produção de β -lactamases (BUSH & JACOB 2010).

Essas enzimas promovem a degradação do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo que ele apresente atividade (SEIBERT et al., 2014). As β -lactamases de maior preocupação para a clínica médica são as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases (ALVES & BEHAR, 2013). Tais enzimas são geralmente codificadas por genes de localização cromossômica e plasmideal, expressas por várias espécies de enterobactérias, incluindo *S. marcescens* (CHIBABHAI, et al., 2018; DARWICH et al., 2019; PICCIRILLI et al., 2019; SU et al., 2017). A pressão seletiva do meio é um dos fatores que contribui para a expressão dos genes produtores de betalactamases, sendo o aumento na concentração de antimicrobianos um dos fatores que induzem ao aumento da expressão desses genes, provocando resistência não identificada nos exames laboratoriais de rotina (DEL PELOSO et al., 2010).

Desta forma, as β -lactamases, incluindo as carbapenemases, são categorizadas empregando classificações amplamente difundidas, como a classificação de Ambler (1980), a qual baseia-se na estrutura molecular das enzimas e inclui todas as β -lactamases descritas em quatro classes: A, B, C e D. As classes A, C e D são compostas por enzimas com serina no sítio ativo, e a classe B é composta por enzimas com zinco em seu sítio ativo (AMBLER, 1980).

2.4.1 Gene *bla*_{KPC}

Os genes da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) aparecem frequentemente inseridos nas estruturas genéticas móveis como plasmídeos, podendo ser facilmente transferidos entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes, acentuando seu potencial de disseminação (NORDMAN et al., 2011).

Da classe A, os genes decodificadores de KPC são os mais comuns e circulam entre as *Enterobacteriaceae* do mundo todo (LOGAN & WEINSTEIN, 2017). KPCs são capazes de hidrolizar todos os antibióticos betalactâmicos, sendo a resistência aos carbapenêmicos geralmente concomitante à resistência a outras classes de antimicrobianos (ECDC, 2017; MELO, 2019), o que confere à bactéria a capacidade de sobreviver e crescer na presença de concentrações clinicamente relevantes de carbapenêmicos (DURANTE-MANGONI et al., 2019). O uso prévio desses medicamentos associado a comorbidades, maior permanência no hospital e/ou UTI, cirurgias e transferência de estabelecimentos de saúde com altas taxas de resistência aos carbapenêmicos são alguns fatores de risco associados à resistência a esta classe antibiótica (VAN LOON et al. 2018). Os antimicrobianos carbapenêmicos pertencem à família dos β -lactâmicos e apresentam ação bactericida (VIVAS et al., 2020),

sendo os mais utilizados: imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, panipenem, biapenem, tebipenem e tomopenem (EL-GAMAL et al. 2017).

Segundo a literatura, 74 alelos do *blaKPC* já foram descritos (*blaKPC-2* a *blaKPC-74*) e depositados no *Genbank*. Destes, *blaKPC-2* e *blaKPC-3* são os mais comumente relatados (LI et al., 2021; REQUENA et al., 2021). RIBEIRO et al. (2013) avaliaram 345 isolados de *Enterobacteriaceae* com sensibilidade reduzida a carbapenêmicos de 11 hospitais brasileiros nos anos de 2009 a 2011 e indentificaram 2,3% de isolados de *S. marcescens* (8 amostras), das quais três apresentaram o gene *blaKPC*. No ano seguinte foram relatados 14 casos de *S. marcescens* identificados pelo VITEK[®], todas KPC positivas, nos testes de PCR (DE OLIVEIRA et al., 2014). Também foi descrito um relato de 12 casos de pacientes com isolados de *S. marcescens*, dos quais seis eram resistentes a carbapenêmicos e KPC positivos (TUON et al., 2017). Em 2021, um trabalho resultante da nossa pesquisa evidenciou o gene *blaKPC-2* em 100% das amostras obtidas de um surto de *S. marcescens* em um hospital terciário em Cuiabá-MT, através do teste de PCR e posterior sequenciamento do gene (CRUZ et al., 2021).

2.4.2 Gene *blaOXA*

As Oxacilinases (*OXA*) são genes de β -lactamases de Classe D de Ambler. *OXAs* são caracterizadas como penicilinases que podem hidrolisar oxacilina e cloxacilina, além de serem pouco inibidas pelo ácido clavulânico e pelo EDTA. O gene *blaOXA-48* é um dos poucos membros desta família a possuir uma atividade notável de hidrólise de carbapenem (POIREL et al., 2004). Descrito pela primeira vez em 2004 na Turquia, começou a se espalhar na Europa e no Oriente Médio (CARRÈR et al., 2010).

Estudos de vigilância mostraram que a carbapenemase *OXA-48* são as carbapenemases mais comuns em *Enterobacterales* em certas regiões do mundo e estão sendo introduzidas regularmente em regiões não endêmicas, onde são responsáveis por surtos nosocomiais. Em 2018, identificaram 26 isolados de *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos que portavam *OXA-48* (REGEV-YOCHAY et al., 2018).

2.4.3 Gene *blaSRT*

Os genes *Serratia marcescens* carbapenemase (*SRT*) codificam β -lactamases

classe C de Ambler. Tais enzimas são β -lactamases de serina, muito parecidas com a classe A, mas com pouca semelhança de sequência com as β -lactamases desta classe. Também são conhecidas como β -lactamases AmpC (WU et al., 2004). *blaSRT* foi relatado pela primeira vez em uma cepa de *S. marcescens* em 2004. Quase todos os relatos subsequentes sobre ele estão relacionados a *S. marcescens*, geralmente associado a diferentes genes de resistência, como *blaTEM*-1, aminoglicosídeo AAC(6')-Ic e *blaKPC*-2 (WU et al., 2004 ; YU et al., 2008 ; SRINIVASAN e RAJAMOHAN, 2019 ; QUEZADA-AGUILUZ et al., 2020).

2.4.4 Gene *blaTEM*

TEM-1 é uma β -lactamase que hidrolisa a ligação amida cíclica no anel β -lactâmico (BERGSTRÖM et al., 1978). Os genes TEM codificam β -lactamases classe A de Ambler e são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, e geralmente incapazes de atacar as cefalosporinas de amplo espectro (SHAIKH et al., 2015). Entretanto, com o surgimento de muitas variantes, as substituições de aminoácidos são variadas, e as combinações dessas trocas de aminoácidos resultam em várias alterações sutis nos fenótipos das ESBLs, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e ceftazidima (SEKI, 2012).

2.4.5 Gene AAC(6')

A enzima Aminoglicosídeo N(6')-acetiltransferase (AAC(6')) tem sido relatada em uma ampla diversidade de agentes Gram-negativos patogênicos. É capaz de modificar um grupo amino específico na molécula de aminoglicosídeos como amicacina, gentamicina, tobramicina e canamicina (DURANTE-MAGONI et al. 2009), transferindo um grupo acetil do acetil-CoA para o aminoglicosídeo. As AAC(6') acetiltransferases modificam os 6 grupos amino primários e são a resistência mais comum aos fármacos aminoglicosídeos (VETTING et al, 2008).

Existe interesse particular na pesquisa da enzima AAC(6') por esta apresentar significativa micro heterogeneidade na extremidade N-terminal da proteína, além do fato do gene codificador AAC(6') estar muitas vezes presente em integrons, transposons, plasmídeos, ilhas genômicas e outros elementos genéticos móveis (RAMIREZ et al. 2013).

2.5 Fatores de Virulência

São inúmeros os relatos que indicam *S. marcescens* como causa de múltiplas infecções nosocomiais. Entretanto, pouco se sabe sobre seus mecanismos de invasão e patogênese. Diversos fatores de virulência potenciais já foram descritos; no entanto, poucos têm seu papel totalmente elucidado. Vários fatores de virulência estão envolvidos na patogênese de *S. marcescens*, sendo alguns deles: hemolisina, fímbrias, proteases, lipases, nucleases, antígenos de parede celular. É por meio da ação coordenada desses fatores que o agente consegue se aderir, invadir células hospedeiras, produzir citotoxicidade e causar a lise celular (HERTLE, 2000; LAZZARO, 2019).

Um dos fatores de virulência frequentemente descrito em *S. marcescens* são as bombas de efluxo (SHIRSHIKOVA et al., 2021). Tais estruturas consistem em um mecanismo de transporte ativo cuja principal função é a remoção de compostos tóxicos do interior da bactéria (LI et al., 2015). Estas proteínas integrantes da membrana plasmática têm sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas, as quais são expelidas para fora da bactéria (PIDDOCK, 2006). Em 1992 foram descritas as primeiras bombas de efluxo em bacilos Gram-negativos: as bombas da família Tet, específicas para a extrusão de tetraciclina do interior da célula bacteriana (LEVY, 1992). A efetiva extrusão de antibióticos resulta em significativa elevação na concentração inibitória mínima (CIM) quando há superexpressão dessas proteínas (SULAVIK et al., 2001). O contrário também já foi observado, em casos onde genes codificantes para essas bombas estão deletados, podendo haver reduções da CIM de até 256 vezes (NISHINO & YAMAGUCHI, 2001), fenômeno que pode acarretar na inibição do crescimento bacteriano (NICHOLS et al., 2011).

2.5.1 Proteína *oqxB*

OqxB é um transportador de membrana de bomba de efluxo RND (Resistance-Nodulation-Division) que surgiu como um fator que contribui para a resistência a antibióticos em *K. pneumoniae*. *OqxB* passou por transferência horizontal de genes e agora é visto em outros patógenos bacterianos Gram-negativos, incluindo *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp., disseminando ainda mais a resistência a múltiplas drogas (BHARATHAM et al., 2021).

2.5.2 Proteína H-NS

A proteína H-NS é uma proteína de ligação ao DNA, semelhante a histonas que participa da regulação gênica (NISHINO & YAMAGUCHI, 2004). Tem sido implicado na expressão de vários sistemas de efluxo, aumentando a resistência aos β -lactâmicos. Estudos também descrevem que H-NS modula a resistência a múltiplas drogas através da repressão dos genes que codificam a bomba de efluxo de múltiplas drogas em *Salmonella enterica* (NISHINO et al., 2009).

2.5.3 Proteína mexI

A proteína *mexI* é uma subunidade de permease do transportador de efluxo de múltiplas drogas RND. Faz parte de um grupo gênico de 4 membros que codifica um sistema de efluxo com papel fisiológico na *P. aeruginosa* (comunicação célula a célula e patogenicidade), além de seus efeitos protetores contra antimicrobianos (PIDDOCK, 2006).

2.5.4 Proteínas *sdeB* / *sdeX* / *sdeY*

Adaptador periplásmico (*sdeX*) dos transportadores de membrana (*sdeB* e *sdeY*). Esse grupo de proteínas confere resistência através do mecanismo de bomba de efluxo RND de múltiplas drogas. As bombas de efluxo de fármacos e biocidas são cassetes de ligação de ATP que são responsáveis pelo efluxo de uma variedade de antibióticos e compostos biocidas intracelulares (LAVILLA et al., 2014).

2.5.5 Proteína *CpxAR*

A proteína *CpxAR* age modulando a sinalização da Proteína periplasmática *CpxP*. Juntas, codificam um sistema regulador que afeta a transcrição de dois sistemas de efluxo que estão implicados na resistência a múltiplas drogas (WEATHERSPOON-GRIFFIN et al., 2014).

2.5.6 Proteína *CRP*

A *CRP* é uma proteína reguladora transcricional, que além de seu papel no controle

de catabólitos, contribui para a multirresistência. O regulador de CRP modula a resistência a múltiplas drogas em *E. coli* através da repressão dos genes que codificam a bomba de efluxo de múltiplas drogas (NISHINO et al., 2008).

2.5.7 Proteína *acrB*

A proteína *acrB* é uma subunidade da bomba de efluxo de múltiplas drogas. O sistema de efluxo *acrB* é um sistema de efluxo de vários medicamentos comuns. *AcrB* foi a primeira estrutura cristalina da bomba de efluxo descrita, uma proteína fundamental do mecanismo de exportação das drogas (SUN et al., 2014).

2.5.8 Proteína *cadA*

ATPase transportadora de cádmio, zinco e cobalto. O grupo de genes *cadA* é uma proteína de resistência ao metal, que medeia a resistência a metais através de um mecanismo de efluxo dependente de ATP e fornece um bom alvo para a seleção de potenciais bioabsorventes de cádmio (ICGEN & YILMAZ, 2016) e outros metais pesados. *CadA* é também essencial para uma indução oportuna do sistema de efluxo atuantes na fagocitose de *P. aeruginosa* por macrófagos, nos quais um reforço de metal tóxico é descarregado no fagolisossoma para intoxicar os microrganismos (DUCRET et al., 2020).

2.5.9 Proteína *rpoS*

Regulador transcricional da fase estacionária e da resposta geral ao estresse oxidativo. O grupo de genes *rpoS* confere resistência a desinfetantes por meio de um mecanismo regulador. A atividade de *rpoS* pode ser induzida na fase de crescimento exponencial por falta de nutrientes, calor, choque e estresse oxidativo. As proteínas *RpoS* e *Dps* foram expressas ativamente nas condições testadas, expressando tais genes quando em contato com hipoclorito de sódio, relacionados ao estresse oxidativo e conferindo resistência ao hipoclorito de sódio em *Salmonella Enteritidis* (RITTER et al., 2012).

2.5.10 Proteína *rcsB*

O sistema Rcs é composto por três proteínas centrais: sensor de membrana interna

quinase RcsC, fosfotransferase RcsD e regulador de resposta RcsB (citoplasmático). RcsB também foi relatado para desempenhar um papel na resistência à polimixina B. Apresenta também envolvimento na regulação da resposta ao estresse ácido no sistema sobre a resistência bacteriana (LIU et al., 2019). RcsB é um repressor da síntese de prodigiosina em *S. marcescens* e fornece informações sobre o mecanismo regulador de RcsB na motilidade celular, produção de polissacarídeo capsular, formação de biofilme e resistência a ácidos em *S. marcescens* (PAN et al., 2021).

2.5.11 Proteína *cheY*

Proteína reguladora da resposta à quimiotaxia. Na quimiotaxia, as células direcionam sua natação de caminhada aleatória para ambientes favoráveis e para longe de ambientes desfavoráveis. Eles fazem isso modulando a direção da rotação flagelar. Esta direção é controlada por uma proteína sinalizadora, CheY, que vai e volta entre os receptores e o motor flagelar (BARON & EISENBACH, 2017).

2.5.12 Proteínas *fliG* / *fliM*

FliG e FliM são proteínas que regulam a rotação e comutação do motor flagelar. Vários modelos de montagem para FliG e FliM foram propostos; no entanto, ainda não está claro se a montagem das proteínas de troca é conservada entre as diferentes espécies bacterianas (LAM et al., 2013).

2.5.12 Proteína *GndA*

Para sobreviver ao aumento abrupto da temperatura, as bactérias expressam proteínas de choque térmico. No entanto, nem todas as proteínas de choque térmico foram totalmente caracterizadas, especialmente os polipeptídeos de baixa abundância, pequenos e associados à membrana. GndA foi descoberta numa abordagem desenvolvida para proteômica de membrana quantitativa, que identificou um peptídeo tríptico aparentemente pertencente a uma pequena proteína de choque térmico previamente desconhecida (YUAN et al., 2018).

2.5.13 Lipoproteína *ECS88_3547*

Lipoproteína do gene NLPI que age como uma proteína adaptadora para hidrolases de peptidoglicano (PG), que fornece às bactérias a resistência mecânica para manter a forma celular e resistir ao estresse osmótico. O alargamento tipo malha requer a atividade combinada de peptidoglicano sintases e hidrolases. NLPI liga-se a diferentes classes de hidrolases e pode formar complexos especificamente com várias PG endopeptidases. O NLPI parece contribuir tanto para o alongamento quanto para a divisão de complexos biossintéticos de PG com base em sua localização e interações genéticas (ecoli_VF_collection; BANZHAF et al., 2020).

2.5.14 Transposon *tnpR*

Transposons são membros da classe de elementos transponíveis que normalmente contêm um ou mais genes, conferindo resistência a agentes antibacterianos. Para que ocorra o processo de transposição, são necessários pelo menos dois genes: *tnpA* e *tnpR*. O gene *tnpR*, que catalisa recombinação entre sítios específicos (*res*) nas duas cópias do elemento, dando o replicon doador original e o replicon do destinatário que agora contém uma cópia do elemento (LIEBERT et al., 1999).

2.5.15 Integron *intl*

Intl consiste num gene de mobilidade como as integrases, que confere a mesma estrutura base de todos os integrons. Tal estrutura é uma alternativa econômica para explorar completamente os cassetes de resistência através do sequenciamento profundo de amplicons *intl*, corroborando a abundância e diversidade de ARGs associados a integrons (DIAS et al., 2021). O integron de classe 1 é frequentemente responsável pela transferência dos cassetes de genes que abrigam Metallo- β -Lactamases (MBLs), especialmente as variantes alélicas *blaVIM* e *blaIMP*, concluindo desta forma que MBLs são geralmente codificadas em cassetes de genes que abrigam integrons (AMIN et al., 2019).

2.6 Sequenciamento do Genoma Completo - SGC (Whole-genome Sequencing - WGS)

A microbiologia clínica utiliza as técnicas moleculares como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico clínico, que engloba desde a identificação de espécies, através do sequenciamento parcial de genes (como 16S ribossomal), para detecção de importantes genes de resistência e/ou virulência, como também para caracterização de surtos, por técnicas de tipagem (DIDELOT et al., 2012). Um método promissor em investigações de surtos é o sequenciamento do genoma completo (SGC), pois permite o reconhecimento mais rápido de um surto com mapeamento preciso da disseminação, facilitando a implementação de medidas de controle de infecção. SGC também fornece informações interessantes sobre a disseminação de genes de resistência e virulência a antibióticos (MUYLDERMANS et al., 2021). Por todos estes fatores, o sequenciamento do genoma tem sido considerado o novo padrão-ouro em epidemiologia microbiana (SABAT et al., 2013).

O sequenciamento completo do genoma se resume em quatro passos, sendo eles:

1. Obtenção de uma biblioteca, composta por pequenos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) da amostra a ser sequenciada;
2. Amplificação desses fragmentos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em emulsão, utilizando-se um único par de iniciadores;
3. Sequenciamento simultâneo destes produtos de amplificação;
4. E por fim, os fragmentos são alinhados a uma sequência conhecida (alinhamento por referência) ou não (alinhamento *de novo*), para a determinação da sequência completa (BENTLEY et al., 2008).

O sistema HiSeq é adequado para projetos que tenham necessidade de produção de grandes volumes de dados de sequenciamento, em curto período. Ele apresenta dois modos de corrida (*Rapid Run* e *High Output Run*), além da capacidade de sequenciar uma ou duas lâminas (*flow cells*) simultaneamente. Esse equipamento gera até 1 terabase (Tb) de dados (Illumina, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estabelecer a confirmação da suspeita de um surto e a presença de genes de resistência e fatores de virulência dos isolados de *S. marcescens* provenientes de um hospital terciário em Cuiabá-Mato Grosso, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Correlacionar os achados fenotípicos e genotípicos dos isolados;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados de *S. marcescens* estudados através do Sequenciamento do Genoma Completo.
- Detectar genes de resistência e fatores de virulência nos isolados de *S. marcescens* através do teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e pelo sequenciamento do genoma completo (WGS).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovações e declarações ética

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa pela Plataforma Brasil do Hospital Universitário Júlio Muller (HUJM), registrado no Sistema Nacional de Avaliação Ética de Projetos de Pesquisa em Humanos (CAAE 17331119.2.0000.5541).

4.2 Local de estudo e isolados

Um total de dez isolados foi obtido de dez pacientes internados na UTI, enfermarias de clínica médica e de clínica cirúrgica do hospital público universitário de serviço terciário de Cuiabá, Mato Grosso, Região Centro-Oeste do Brasil. O Hospital Universitário Júlio Muller (HUJM) possui 118 leitos. As amostras foram coletadas dos pacientes como rotina do hospital em investigação de surtos em novembro de 2018.

4.3 Dados clínicos dos pacientes

Os dados foram coletados através da análise de prontuários e preenchimento de fichas clínicas. Foram coletados os seguintes dados:

- Sexo e idade dos pacientes;
- Dias de internação até o isolamento da *S. marcescens* em cultura;
- Local e Desfecho da internação;
- Antibimicrobianos utilizados no tratamento;
- Suceptibilidade aos antimicrobianos utilizados.

4.4 Identificação

A identificação da *S. marcescens* das amostras foi realizada no sistema Vitek2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e confirmada pela técnica de MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight)

4.5 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade foram baseados na Concentração Inibitória Mínima pela técnica de microdiluição em caldo (MIC) pelo sistema Bact/Alert 3D e Vitek2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), onde foram testadas sete classes de antimicrobianos: **Penicilina** (Piperaciclina + tazobactam), **Cefalosporina** (Cefepime), **Polimixina** (Polimixina B), **Carbapenêmicos** (Imipenem, Ertapenem, Meropenem), **Fluorquinolona** (Ciprofloxacina), **Aminoglicosídeos** (Gentamicina, Amicacina), **Glicilciclina** (Tigeciclina).

Os isolados foram classificados como sensível, resistente ou intermediário de acordo com Clinical & Laboratory Standards Institute Guidelines (CLSI, 2017).

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados foi realizada com a inoculação das colônias em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubação sob agitação a 37°C *overnight*. Após centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 1mL tampão de lise (100mM, NaCl, 25mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS, 0,1mg Proteinase K), e tratado com fenol-clorofórmio de acordo com o Sambrook e Russel (2004). O DNA foi ressuspenso com 50 µl de água ultra pura. A integridade e qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese à 100V por 40min em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red (Biotium) e visualizados no ChemiDoc™ XRS utilizando o software ImageLab™®. Posteriormente, o material foi armazenado à -20°C até a utilização nos testes moleculares.

4.7 PCR para detecção dos genes de resistência e fatores de virulência

Os dez isolados de *S. marcescens* foram submetidos a PCR para quatro genes de resistência e virulência, utilizando as sequências de oligonucleotídeos descritas na Tabela

1. As amplificações dos genes de resistência e virulência foram realizadas em termociclador My Cyclex™ (Biorad) com desnaturação inicial do DNA, sucedido de desnaturação, extensão da cadeia nucleotídica, seguidos de uma extensão final, de acordo com as referências utilizadas (Tabela 1). Os produtos de PCR foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose, corado com Gel Red™ (Biotium®) a 10 V/cm e visualizados em fotodocumentador ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image Lab™. O marcador de massa molecular empregado foi o Ladder™ (Ludwig®; 0.1µg/µl; 100bp).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na reação em cadeia de polimerase para detecção de genes de resistência, tamanho molecular do produto amplificado e sua referência bibliográfica.

Gene	Sequência (5' – 3')	Produto (pb)	Referência
OXA-48	F-ATG CGT TGA TTA GCC TTA TC	798	WANG et al. (2016)
	R-CTA GGG AAT AAT TTT TTC CT		
KPC-2	F-TGT CAC TGT ATC GCC GTC	1011	YIGITI et al. (2001)
	R-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC		
TnpR	F-CGA CAC TGC CCG ATA TGA TCC	303	PARK et al. (2009)
	R-CGG GCA ATA CTG AGC TGA TG		
intl1	F-GCC TTG VTG TTC TTC TAC GG	558	HAN et al. (2004)
	R-GAT GCC TGC TTG TTC TAC GG		

4.8 Sequenciamento dos Genes

Posteriormente, os produtos obtidos pela PCR foram purificados com o kit GFX™ PCR DNA e utilizados na reação de sequenciamento, juntamente com o BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram confrontadas com o banco de dados do GenBank usando o BLAST no servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.9 Whole-genome Sequencing (WGS)

As amostras de *S. marcescens* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) sob agitação a 37°C overnight. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 1mL tampão de lise (100mM, NaCl, 25mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS, 0,1mg Proteinase K), e tratado com fenol-clorofórmio de acordo com o Sambrook e Russel (2004). Posteriormente foi realizada a quantificação do DNA pelo Qubit® Fluorometer 2.0 (Life

Technologies – Texas A&M Institute for Genome Sciences and Society), a fim de quantificar 3 µg (3000 nanogramas) de DNA, eluídas em TE (com volume final de 75 µl) para envio e sequenciamento completo do genoma pela equipe de pesquisadores da Rede de Ciências Ômicas (Recom) da Universidade Federal do Vale São Francisco (Univasf).

O sequenciamento do genoma completo foi realizado usando *kit* Illumina HiSeq 2500 (Illumina Inc.) com cobertura acima de 1000×. A montagem e anotação de genomas foram analisadas com o montador Unicyler v 0.5.0 (pipeline de montagem híbrida para genomas isolados de bactérias) (WICK et al., 2017). Realizou-se a montagem *De-novo* do adaptador Illumina Seq livre e correção de erros dos dados. Prokka 1.13.4 (SEEMANN, 2014) foi usado para predição de genes.

4.10 Análise Bioinformática

Com o DNA sequenciado foram investigados genes de virulência e enzimas responsáveis pela resistência a antimicrobianos utilizando a ferramenta ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), que identifica genes de interesse no genoma ao compará-lo com bancos de dados, por meio do alinhamento de sequências. Os genes de resistência foram pesquisados nas plataformas NCBI (National Center For Biotechnology Information), ResFinder (ZANKARI et al., 2012), ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), MEGARES (Microbial Ecology Group), VFDB (Virulence Factors of Bacterial Pathogens) e Ecoli_vf (*Escherichia coli* virulence factors).

Todos os genomas foram alinhados com o genoma de referência de *S. marcescens* KS10 5238547, disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Com os genomas montados, foi construído um mapa comparativo dos mesmos.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse estudo serão apresentados no formato de artigos (Artigos 1 e 2):

- Artigo 1: Outbreak of KPC-2 producing *Serratia marcescens* MDR in a tertiary hospital in the Midwest region, Brazil.
- Artigo 2: Whole-genome sequencing analysis of multidrug-resistant *Serratia marcescens* isolates in an intensive care unit of the Midwest region, Brazil.

Artigo	Revista	Situação	Métricas/ Qualis	Fator de Impacto
Outbreak of KPC-2 producing <i>Serratia marcescens</i> MDR in a tertiary hospital in the Midwest region, Brazil	Research, Society and Development	Publicado	Índice H5 (Google Metrics): 21 (2022)	-
Whole-genome sequencing analysis of multidrug-resistant <i>Serratia marcescens</i> isolates in an intensive care unit of the Midwest region, Brazil	The Journal of Infection in Developing Countries	Aceito para publicação (em edição)	Qualis B2	2.512

As informações e dados clínicos dos pacientes acometidos por *Serratia marcescens*, tratamentos utilizados e desfechos clínicos; características genômicas das *S. marcescens* analisadas, bem como os genes de resistência e virulência detectados por sequenciamento genômico estão disponibilizados a seguir em forma de tabelas.

Tabela 2: Dados dos pacientes, tipos de amostra estudada, perfil de susceptibilidade aos antibióticos, doença de base e desfecho do quadro clínico.

Nº	Paciente (idade/ gênero)	Isolamento de <i>S. marcescens</i>	Amostra	Sensibili- dade	Resistência	Doença de Base	Desfe- cho
S1	74, M	17/11/18	Aspirado traqueal	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Neurocriptococcose	Óbito
S2	84, F	11/11/18	Aspirado traqueal	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Infarto agudo do miocárdio	Óbito
S3	60, M	08/11/18	Ponta de cateter	GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI, TG	Adenocarcinoma de próstata	Alta
S4	63, F	17/11/18	Swab retal	GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI, TG	Hanseníase	Alta
S5	57, M	09/11/18	Líquido pleural	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Aspergilose pulmonar	Alta
S6	71, M	19/11/18	Aspirado traqueal	TG	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI, GEN	HIV e Pneumocistose	Óbito
S7	40, F	09/11/18	Swab retal	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Hanseníase e colecistite	Alta
S8	56, M	10/11/18	Secreção abdominal	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Hérnia diafragmática e laparotomia de urgência	Alta
S9	18, F	14/11/18	Líquido sinovial	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Hérnia diafragmática e laparotomia de urgência	Alta
S10	65, M	10/11/18	Sangue	TG, GEN	PPT, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CPM, AMI	Pênfigo foliáceo e insuficiência renal dialítica	Óbito

PPT: Piperaciclina + tazobactam; **CPM:** Cefepime; **POL:** Polimixin B.; **IMP:** Imipenem; **ETP:** Ertapenem; **MER:** Meropenem; **CIP:** Ciprofloxacina; **AMI:** Amicacina; **TG:** Tigeciclina; **GEN:** Gentamicina

Tabela 3: Características genômicas de *Serratia marcescens* XDR clonal de surto de pacientes de UTI, Cuiabá-MT.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Contigs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bases	5017862	5022821	5022695	5022821	5022818	5022919	5022802	5022373	5022802	5022725
CDS	4598	4602	4603	4602	4603	4603	4603	4603	4603	4602
Gene	4677	4684	4685	4684	4685	4686	4685	4685	4685	4681
rRNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
tRNA	77	80	80	80	80	81	80	80	80	77
tmRNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 4: Genes de virulência e resistência sequenciados nos isolados de *S. marcescens*.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6
HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS
SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT
SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB
MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI
-	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM
SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX
SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY
CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR
CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP
oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB	oqxB
RcsB	rcsB	RcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB
cheY	cheY	CheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY
FliM	fliM	FliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM
FliG	fliG	FliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG
gndA	gndA	GndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA
AcrB	acrB	AcrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB
rpoS	rpoS	RpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS
cadA	Cada	Cada	cadA	cadA	Cada	cada	cadA	Cada	cadA
ECS88	ECS88_	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88_	ECS88	ECS88
_3547	3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	3547	_3547	_3547

ARTIGO 1

Research, Society and Development, v. 10, n. 9, e45110918078, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18078>

Outbreak of KPC-2 producing *Serratia marcescens* MDR in a tertiary hospital in the Midwest region, Brazil

Surto de *Serratia marcescens* MDR produtora de KPC-2 em hospital terciário da região Centro- Oeste, Brasil

Brote de *Serratia marcescens* MDR productora de KPC-2 en hospital terciario de la región CentroOeste, Brasil

Received: 07/09/2021 | Reviewed: 07/19/2021 | Accept: 07/22/2021 | Published: 07/30/2021

Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0167-6710>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: thaly.pri@hotmail.com

Francisco Kennedy Scofoni Faleiros de Azevedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0477-9501>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: fksfazevedo@gmail.com

Marco Andrey Pepato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7896-6329>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: mcoandrey@gmail.com

Alessandra Tammy Hayakawa Ito de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7524-2173>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: tammyhito@gmail.com

Paula Sossai Rizzo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0934-5139>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: paulasossai@yahoo.com.br

Francisco José Dutra Souto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2529-4119>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: fsouto@gmail.com

Luciano Nakazato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1244-0690>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: lucnaka@gmail.com

Valéria Dutra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6630-2293>

Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil

E-mail: valeriadutra.dutra@gmail.com

Abstract

About 700,000 deaths per year worldwide are caused of Healthcare-related infections (HAI). Result in significant patient morbidity and mortality, being is ranked the fourth leading cause of death in Brazil. Usually, HAI are caused by multidrug-resistance microorganisms (MDR), as well as *Serratia marcescens*, that is associated with healthcare- related infections causing high patient mortality and morbidity. This paper describes an outbreak of *S. marcescens* MDR carrier gene *blaKPC-2* in a university hospital, with the need to broadly combat horizontal transmission of this bacterium between patients, as well as the need to optimize treatment with other antimicrobial classes due to resistance of this microorganism to polymyxins. Ten isolates were analyzed for the presence of carbapenemic resistance gene *blaKPC-2*. This gene was detected in all isolates, with a corresponding high patient mortality rate, highlighting the importance of its molecular detection, which corroborates the resistance of *S. marcescens* to carbapenem antibiotics. The detection of this gene is necessary due to the importance to broadly combat horizontal transmission of this bacterium between patients, as well as the need to optimize treatment with other antimicrobial agents due to its resistance to polymyxins.

Keywords: *S. marcescens*; Health-related infection; Outbreak; *BlaKPC*.

Resumo

Cerca de 700.000 mortes por ano em todo o mundo são causadas por infecções relacionadas à saúde (IRA). Resultam em significativa morbimortalidade de pacientes, sendo classificada como a quarta maior causa de óbito no Brasil. Geralmente, as IRAS são causadas por microrganismos multirresistentes a antimicrobianos (MDR), assim como *Serratia marcescens*, que está associada a infecções relacionadas à saúde, causando alta mortalidade e morbidade dos pacientes. Este trabalho descreve um surto causado por *S. marcescens* MDR portadora do gene *blaKPC-2* em um hospital universitário, com a necessidade de combater amplamente a transmissão horizontal dessa bactéria entre os pacientes, bem como a necessidade de otimizar o tratamento com outras classes de antimicrobianos devido à resistência deste microrganismo às polimixinas. Dez isolados foram analisados quanto à presença do gene de resistência carbapenêmico *blaKPC-2*. Este gene foi detectado em todos os isolados, com correspondente taxa de mortalidade alta dos pacientes, evidenciando a importância de sua detecção molecular, que corrobora com a resistência de *S. marcescens* aos antibióticos carbapenêmicos. A detecção deste gene faz-se necessária devido à importância de combater amplamente a transmissão horizontal dessa bactéria entre os pacientes, bem como a necessidade de otimizar o tratamento com outros antimicrobianos devido à sua resistência às polimixinas.

Palavras-chave: *S. marcescens*; Infecção relacionada à saúde; Surto; *BlaKPC*.

Resumen

Aproximadamente 700.000 muertes por año en todo el mundo son causadas por infecciones asociadas a atención de salud (IAAS) las cuales resultan en significativa morbimortalidad de pacientes. Como consecuencia estas infecciones son clasificadas como la cuarta mayor causa de muertes en Brasil. Generalmente, las IAAS, son causadas por microorganismos multirresistentes a los antimicrobianos (MDR, del inglés multidrug-resistance), así como el *Serratia marcescens*, que está asociado a infecciones relacionadas a la atención intrahospitalar. Este trabajo describe un brote causado por *S. marcescens* multirresistente portadora del gen

blaKPC-2 en un hospital universitario. Delante de la necesidad de combatir eficazmente la transmisión horizontal de esta bacteria entre los pacientes y también la necesidad de optimizar el tratamiento con otras clases de antimicrobianos debido a la resistencia de este microorganismo a las polimixinas, fueron analizadas diez muestras en relación a la presencia del gen de resistencia carbapenémico *blaKPC-2*. Este gen fue detectado en todas las muestras con tasa de mortalidad alta, evidenciando la importancia de su detección molecular, además de corroborarse la resistencia de *S. marcescens* a los antibióticos carbapenémicos. Este estudio se hace necesario debido a la importancia de combatir la transmisión horizontal de la bacteria entre los pacientes, como también es importante mejorar el tratamiento con otros antimicrobianos delante de la resistencia a las polimixinas.

Palabras clave: *S. marcescens*; Infección asociadas a atención de salud; Brote; *BlaKPC*.

Introduction

Healthcare-related infections (HAI) are considered a serious medical and social problem, resulting in significant patient morbidity and mortality. They are caused by multidrug-resistance microorganisms (MDR), causing about 700,000 deaths per year worldwide, and may reach ten million by the year 2050 (IACG, 2019). In developing countries, HAI may be up to 20 times higher than in developed countries (Allegranzi et al., 2011). In Brazil, HAI occupy the fourth leading cause of death (Silva & Lincopan, 2012).

Serratia marcescens (*S. marcescens*) can be isolated in the skin, tracheal secretion, urine and feces of critically ill patients, also found in contaminated invasive medical devices, intravenous and topical solutions, liquid soaps and intensive care unit (ICU) air conditioning, favoring the emergence of colonization of patients and hospital outbreaks (Polilli, et al., 2011). According to Quezada-Aguiluz et al. (2020), this opportunistic pathogen of interest to public health has been neglected, even with high rates of antimicrobial resistance.

S. marcescens stands out for its intrinsic and acquired resistance to a variety of antibiotic classes, including β -lactams, aminoglycosides, quinolones, macrolides and polypeptides (Sandner-Miranda et al., 2016). Thus, the drugs that present greater efficacy in the treatment of infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria are the carbapenems however, there has been an increase in resistance rates to these antibiotics in recent years in this group (Cristina et al., 2019), which can be explained by the fact that carbapenemase (KPC) genes are often inserted through conjugative plasmids, which makes *S. marcescens* resistant to carbapenems, causing great concern for the reduction of therapeutic options in AIH (Silva et al., 2015).

This study describes the outbreak of *S. marcescens* MDR carrier gene *blaKPC-2* in a university hospital, with the need to broadly combat horizontal transmission of this

bacterium between patients, as well as the need to optimize treatment with other antimicrobial classes due to resistance of this microorganism to polymyxins.

Methodology

A total of ten isolates were obtained from ten ICU patients, medical and surgical wards of a tertiary public university hospital in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil's Midwestern Region, which has 118 beds. Samples were collected from patients as hospital routine between September and December 2018 (Table 1). The identification of *S. marcescens* of the samples was performed in the Vitek2 system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) and confirmed by the MALDI-TOF technique (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight).

Table 1: Patient clinical data: Age, sex and underlying disease of the patients included in the study; Sample type; Patient's situation and place of admission; Length of stay; Outcome of the patient.

Patient's age (years), sex, underlying disease	Type of sample	Patient situation and location hospital admission	Time to hospitalization (days)	Outcome
74, M, Neurocryptococcosis	Aspirated tracheal	MVAP *, adult ICU**	84	Death
84, F, acute myocardial Infarction	Aspirated tracheal	MVAP *, medical clinic ward	53	Death
60, M, adenocarcinoma of Prostate	Tip of catheter	Colonization, ambulatory	Not hospitalized	Cure
63, F, leprosy	Rectal swab	Sepse, medical clinic ward	27	Cure
57, M, pulmonary aspergillosis	Pleural liquid	Pneumonia, medical clinic Ward	36	Cure
71, M, HIV and Pneumocystosis	Aspirated tracheal	Pneumonia, ICU**	61	Death
40, F, leprosy and cholecystitis	Rectal swab	Colonization, ICU** and Clinic Surgical ward	30	Cure
56, M, diaphragmatic hernia and emergency laparotomy	Abdominal secretion	Intrabdominal infection, clinic Surgical ward and ICU	49	Cure
18, M, hemolytic anemia and disseminated histoplasmosis	Synovia ILiquid	Septic elbow arthritis, medical clinic ward	85	Cure

65, M, pemphigus foliaceus and dialytic renal failure	Blood	Bloodstream infection, ICU	33	Death
---	-------	----------------------------	----	-------

* MVAP: mechanical ventilation-associated pneumonia / ** ICU: intensive care unit Source: Authors

Susceptibility profiles were based on Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Bact / Alert 3D and Vitek2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), where seven classes of antimicrobials were tested. Isolates were classified as sensitive, resistant, or intermediate sensitive according to Clinical & Laboratory Standards Institute Guidelines (CLSI, 2017).

Genomic DNA extraction from isolates was performed by the phenol-chloroform method according to Sambrook and Russel (2004). The extracted DNAs were submitted to PCR of the KPC-2 carbapenemase resistance gene. The oligonucleotide sequence used was that described by Yigiti et al. (2001). Subsequently, the PCR product was purified with the GE Healthcare Life Sciences illustra ExoProStar Kit and used in the sequencing reaction along with the BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems) in auto sequencer 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Results and Discussion

Of the ten patients, six were male (60%) and four female (40%). The average age of the patients was 58.8 ($\pm$ 18.56) years. The clinical data of the patients are described in Table 1, and the patients presented severe intercurrent diseases demonstrating the opportunistic infection character of *S. marcescens* (Polilli et al., 2011).

In this study, the mortality rate was 40% (4/10), similar to other reports that varied from 14 to 60% (Arslan et al., 2010; Milisavljevic et al., 2004), requiring a larger study relating the search for resistance genes of isolates and mortality, as HAI along with antimicrobial resistance, especially carbapenem resistance, increase patient mortality and morbidity rates, as well as their costs and length of stay (Kaleem et al., 2010).

The isolates showed in vitro resistance to the following antimicrobial classes: penicillins (piperacillin / tazobactam n=10, 100%), cephalosporins (cefepime n=10, 100%), carbapenemics (imipenem n=10, 100%; meropenem n=10, 100%; ertapenem n=10, 100%), quinolones (ciprofloxacin n=10, 100%), polymyxins (polymyxin B n=10, 100%). The emergence of antimicrobial resistance in *S. marcescens* is preceded by widespread use of the antibiotic in hospital settings such as beta- lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones (Jones, 1998; Hejazi & Falkiner, 1997) and colistin (Silva et al., 2015). In relation to aminoglycosides, 100% were resistant to amikacin and 10% to gentamicin. This difference may be associated with the occurrence of the gene pREM-1 [aac (6') – 30] conferring reduced susceptibility to amikacin and not gentamicin (Mendes et al., 2004).

The best result was glycylycyclines (tigecycline) with only 20% resistance, however the occurrence of SdeXY-HasF efflux pumps in *S. marcescens* decreases their activity as well as gallbladder excretion that may make treatment difficult of urinary infections (Hornsey, 2010; Peleg & Hooper, 2010).

Only one patient was resistant to all classes of antimicrobials. In addition to this, two patients had intermediate sensitivity to tigecycline and one patient with intermediate sensitivity to gentamicin, gentamicin and tigecycline being the only antimicrobials to which isolates were susceptible. All patients who died had susceptibility to gentamicin and tigecycline, except one patient who had intermediate sensitivity to gentamicin (Table 2).

Table 2: Classes of antibiotics, antimicrobial used and their respective microbial resistance rates (%).

Antimicrobial Classes	Antibiotic	Resistance
Penicillins	Piperacillin + tazobactam	100% (10/10)
Cephalosporins	Cefepime	100% (10/10)
Carbapenemics	Imipenem	100% (10/10)
	Meropenem	100% (10/10)
	Ertapenem	100% (10/10)
Quinolones	Ciprofloxacin	100% (10/10)
Polymyxins	Polymyxin B	100% (10/10)
Aminoglycosides	Gentamicin*	20% (2/10)*
Glycylycyclines	Tigecycline*	30% (3/10)*

*The intermediate sensitivity isolates were considered resistant.
Source: Authors.

All isolates were carbapenem resistant and blaKPC-2 gene detection was observed in all isolates (Figure 1), with imipenem, meropenem and ertapenem resistance phenotypes. This finding is associated with high mortality rate compared to KPC negative isolates (Silva et al. 2015).

The bacteria of the Enterobacteriaceae family that extended-spectrum β -lactamase producing and resistant to carbapenem antibiotics have been classified by the World Health Organization (WHO) as critical pathogens for which further research is

urgently needed (Tacconelli et al., 2018). In Brazil, other genes such as *blaIMP-10*, *blaSME-4* and *blaTEM1* have also been described, emphasizing the need for investigation of carbapenemic resistance genes due to the great importance of this antimicrobial class in the treatment of, especially in a healthcare setting where carbapenems are primarily used as a last-line treatment for gram-negative MDR bacterial infections HAI (Cayô et al. 2017; Margate et al. 2015; Silva et al. 2015).

Figure 1: Amplification of the KPC-2 gene fragment (1011bp) in all isolates (1-10). Channels: 1 - M: marker (Ladder 100bp); 2 - CN:negative control; 3- CP: positive control; 4- 13: positive patient samples.



Source: Personal archive.

Due to the intrinsic resistance of *S. marcescens* to polymyxins (Silva et al. 2015; Denervaud-Tendon et al., 2017), finding the presence of carbapenemases becomes essential for the choice of the most appropriate antibiotics in order to achieve therapeutic success.

Conclusion

We observed that *S. marcescens* isolates from this study caused high mortality with high resistance profile. Thus, genomic studies should be performed in order to clarify whether such microorganisms are clonal in Cuiabá, alerting to the importance of *S. marcescens* in the Midwest region and possibly in other regions of Brazil. It is concluded that rapid detection methods should be performed in reference health units to verify early detection of resistance genes and to improve antimicrobial treatment, reducing the

horizontal transfer of antimicrobial resistance genes.

Approvals and ethical statements

The research project was approved by the Research Ethics Committee of the Júlio Muller University Hospital, and was registered with the National System of Ethical Evaluation of Human

Research Projects (CAAE 17331119.2.0000.5541).

References

- Allegranzi, B., Bagheri Nejad, S., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., & Pittet, D. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 377 (9761), 228-241. doi:10.1016/S0140-6736(10)61458-4
- Arslan, U., Erayman, I., Kirdar, S., Yuksekkaya, S., Cimen, O., Tuncer, I., & Bozdogan, B. (2010). *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics International*, 52, 208-212. doi:10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x
- Cayô, R., Leme, R.C., Streling, A.P., Matos, A.P., Nodari, C.S., Chaves, J.R., Brandão, J.L., De Almeida, M.F., Carrareto, V., De Castro Pereira, M.A., De Almeida, J.P., Ferreira, D.C., & Gales, A.C. (2017). *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: a silent threat. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87, 357-358. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.00
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 27th informational supplement M100." Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, pp. 46-48.
- Cristina, M.L., Sartini, M., & Spagnolo, A.M. (2019). *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, (610), 1-10. doi:10.3390/ijerph16040610
- Denervaud-Tendon, V., Poirel, L., Connolly, L.E., Krause, K.M., & Nordmann, P. (2017). Plazomicin activity against polymyxin-resistant Enterobacteriaceae, including MCR-1-producing isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (10), 2787-2791. doi:10.1093/jac/dkx239
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG) (2019). No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6
- Hejazi, A., & Falkiner, F.R. (1997). *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 903-912. doi.org/10.1099/00222615-46-11-903
- Hornsey, M., Ellington, M.J., Doumith, M., Hudson, S., Livermore, D.M., & Woodford, N. (2010). Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofloxime. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 479-482. doi:10.1093/jac/dkp475
- Jones, R.N. (1998) Important and emerging beta-lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the Amp C enzymes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 31, 461-466. doi:10.1016/s0732-8893(98)00029-715
- Kaleem, F., Usman, J., Hassan, A., & Khan, A. (2010). Frequency and susceptibility pattern of metallo-beta-lactamase producers in a hospital in Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4 (12), 810-813. doi: 10.3855/jidc.1050
- Margate, E., Magalhães, V., Fehlberg, L.C.C., Gales, A.C., & Lopes, A.C.S. (2015). KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57 (4), 359-360. doi: 10.1590/S0036-46652015000400016
- Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Jones, R.N., & Walsh, T.R. (2004). Integron carrying a novel metallo-β-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal*, 48, 4693-4702. doi:10.1128/AAC.48.12.4693-4702.2004
- Milisavljevic, V., Wu, F., Larson, E., Rubenstein, D., Ross, B., Drusin, L.M., Della-Latta, P., & Saiman, L. (2004). Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* outbreaks in two neonatal intensive care units. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 25, 719-721. doi 10.1086/502466
- Peleg, A.Y., & Hooper, D.C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, 362, 1804-1813. doi: 10.1056/NEJMr0904124
- Polilli, E., Parruti, G., Fazii, P., D'Antonio, D., Palmieri, D., D'Incecco, C., Mangifesta, A., Garofalo, G., Del Duca, L., D'Amaro, C.,

- Scimia, M., Cortesi, V., & Fortunato, V. (2011). Rapidly controlled outbreak of *Serratia marcescens* infection/colonisations in a neonatal intensive care unit, Pescara General Hospital, Pescara, Italy. *Euro Surveill* 16 (24), 1-3. doi:10.2807/ese.16.24.19892-pt
- Quezada-Aguiluz, M., Lincopan, N., Cerdeira, L., Fuga, B., Silva, F., Barrera, B., Cifuentes, M., Bello-Toledo, H., Opazo-Capurro, A., & González-Rocha, G. (2020). Draft genome sequence of a multidrug-resistant KPC-2 and SRT-2 co-producing *Serratia marcescens* strain isolated from a hospitalised patient in Chile. *Journal of Global Antimicrobial Resistanc*, 21, 1-2. doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.004
- Sambrook, J., & Russel, D.W. (2004). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 5.65-5.67.
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Soberón-Chávez, G., & Morales-Espinosa, R. (2016). Complete genome sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a nonpigmented multidrug-resistant strain isolated from a Mexican patient with obstructive pulmonary disease. *Genome Announcements*, 4 (1), e01417-15. doi: 10.1128/genomeA.01417-15.
- Silva, K.C., & Lincopan, N. (2012) Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: Clinical impact and implications for agribusiness. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 48 (2), 91-99. doi:10.1590/S1676-24442012000200004
- Silva, K.E., Cayô, R., Carvalhaes, C.G., Sacchi, F.P.C., Rodrigues-Costa, F., Silva, A.C.R., Croda, J., Gales, A.C., & Simionatto, S. (2015). 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*, 53 (7), 2324-2328. doi:10.1128/JCM.00727-15.
- Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersen, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., & Magrini, N. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (3), 318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Yigiti, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., & Steward, C.D. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45 (4), 1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

ARTIGO 2

Publicado no periódico “The Journal of Infection in Developing Countries”
(JIDC) – FI: 2.512

Notifications



[JIDC] Editor Decision

2023-10-04 18:29 BST

THALITA DA CRUZ, Francisco Kennedy, Marco A. Pepato, Paula Sossai, Francisco Souto, Bertram Brenig, Aristóteles Góes-Neto, Siomar Castro Soares, Rommel Ramos, Vasco Azevedo, Mateus Matiuzzi, Leonardo Broetto, Luciano Nakazato, Valéria Dutra:

We have reached a decision regarding your submission to The Journal of Infection in Developing Countries, "Whole-genome sequencing analysis of multidrug-resistant *Serratia marcescens* isolates in an intensive care unit of the Brazil".

Our decision is to: Accept submission

Dear authors, congratulations. A member of the editorial team will connect to continue with the editorial process.

Best regards

--

The Journal of Infection in Developing Countries

Original Article

Whole-genome sequencing analysis of multidrug-resistant *Serratia marcescens* isolates in an intensive care unit in Brazil

Thalita PPS Cruz¹, Francisco KSF Azevedo², Marco A Pepato², Paula S Rizzo², Francisco JD Souto², Bertram Brenig³, Aristóteles Góes-Neto⁴, Siomar C Soares⁵, Rommel TJ Ramos⁶, Vasco AC Azevedo⁷, Mateus M Costa⁸, Leonardo Broetto⁹, Luciano Nakazato¹, Valéria Dutra¹

¹ Laboratory of Veterinary Microbiology and Molecular Biology, Veterinary Hospital of Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

² Department of Internal Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

³ Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Göttingen, Niedersachsen, Germany

⁴ Laboratory of Molecular Computational Biology of Fungi (LBMCF), Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵ Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Triangle Miner, Uberaba, Brazil

⁶ Center of Genomics and Systems Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil

⁷ Laboratory of Cellular and Molecular Genetics (LGCM), Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁸ Laboratory of Microbiology and Animal Immunology, Federal University of Vale of São Francisco (Univasf), Petrolina, Pernambuco, Brazil - Center for Open Access Genomic Analysis (CALAnGO), Federal University of Vale of São Francisco (Univasf), Petrolina, Pernambuco, Brazil

⁹ Multicentric Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology at SBBq (PMBqBM), Federal University of Alagoas, Brazil

Abstract

Introduction: *Serratia marcescens* is an opportunistic pathogen found ubiquitously in the environment and associated with a wide range of nosocomial infections. This multidrug-resistant bacterium has been a cause of concern for hospitals and healthcare facilities due to its ability to spread rapidly and cause outbreaks. Next generation sequencing genotyping of bacterial isolates has proven to be a valuable tool for tracking the spread and transmission of nosocomial infections. This has allowed for the identification of outbreaks and transmission chains, as well as determining whether cases are due to endogenous or exogenous sources. Evidence of nosocomial transmission has been gathered through genotyping methods. The aim of this study was to investigate the genetic diversity of carbapenemase-producing *S. marcescens* in an outbreak at a public hospital in Cuiabá, MT, Brazil.

Methodology: Ten isolates of *S. marcescens* were sequenced and antibiotic resistance profiles analyzed over 12 days.

Results: The isolates were clonal and multidrug resistant. Gentamycin and tigecycline had sensitivity in 90% and 80% isolates, respectively. Genomic analysis identified several genes that encode β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, efflux pumps, and other virulence factors.

Conclusions: Systematic surveillance is crucial in monitoring the evolution of *S. marcescens* genotypes, as it can lead to early detection and prevention of outbreaks.

Key words: *Serratia marcescens*; outbreak; antimicrobial resistance; genomic sequencing.

J Infect Dev Ctries 2024; 18(5):726-731. doi:10.3855/jidc.18913

(Received 18 July 2023 – Accepted 04 October 2023)

Copyright © 2024 Cruz *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Serratia marcescens belongs to the Enterobacteriaceae family and causes infections and outbreaks in hospital settings that usually involve multidrug-resistant strains [1]. Considerable mortality rates, ranging from 14% to 60%, result from outbreaks of *S. marcescens* infections in intensive care units (ICUs) [2,3].

The main mechanism of carbapenem resistance among Enterobacteriaceae is the production of carbapenemases [4]. Carbapenems are the most effective drugs in the treatment of infections caused by multidrug resistant Gram-negative bacteria, but the recent increase in antibiotic resistance rates in this group has reduced therapeutic options, including in the case of *S. marcescens*, which has intrinsic resistance to several antimicrobial agents, such as polymyxins [5-8].

In addition, it has the ability to acquire multiple mechanisms of virulence and resistance to drugs used during antimicrobial treatment [9,10].

S. marcescens strains with resistance to carbapenems have been reported in Brazil and are associated exclusively with the production of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) [2,11-13]. Genotyping of *S. marcescens* has proven to be a valuable tool in tracking the spread and transmission of nosocomial infections [14].

Various molecular typing methods have been employed to identify genotypic differences and genetic relatedness among other nosocomial bacteria isolates [15]. Genomic sequencing is a powerful tool used in investigation of outbreaks to characterize and determine whether the individual microbial strains associated with the infections are identical or closely related to each other [16].

Furthermore, genotyping of antimicrobial resistance genes and virulence factors, such as fimbriae, flagella, and biofilms associated with bacterial movement, fixation, and colonization, indicates increased bacterial persistence and pathogenicity in individuals and environmental reservoirs [17].

This study aimed to characterize the genome of an isolate of *S. marcescens* that caused an outbreak in the ICU of the Tertiary Public Hospital in the Cuiaba, Mato Grosso state of Brazil. This study has great local relevance as it is the first investigated and confirmed outbreak of *S. marcescens* in the state, that led to potential insights that require investigation.

Methodology

Patients and samples

S. marcescens was isolated from ten patients (six males and four females), who had serious complications including underlying diseases, demonstrating the nature of an opportunistic infection by the pathogen. The mean age of the patients was 58.8 ($\pm$ 18.56) years. Admissions to the Tertiary Public Hospital in the city of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil, occurred between 8 and 19 November 2018, as described by Cruz et al. [7].

Antibiotic resistance to piperacillin + Tazobactam, cefepime, imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloxacin, polymixin B, amikacin, gentamycin, and tigecycline was analyzed using a VITEK 2 system (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, France). The VITEK-2 system is used to detect and identify isolated microorganisms, as well as perform automated microorganism sensitivity tests, providing precision and speed in results, thus ensuring agility for faster

therapeutic decisions. The average time between collection of the sample for pathogen diagnosis and the subsequent detection of drug sensitivity to the antimicrobial agent was approximately five days.

Epidemiological data

An outbreak occurs when there is a greater than expected increase in the number of infections or colonization by multidrug resistant bacteria in hospitalized patients. This outbreak emerged suddenly, affecting patients admitted to the adult ICU and the internal medicine ward (where ICU patients are transferred after discharge due to clinical improvement).

The measures implemented to contain and control the outbreak were as follows. Firstly, incidence of the outbreak was communicated to all sections of the hospital, including the management. Subsequently, new admissions to the hospital's ICU and medical clinic ward were suspended. Contact precautions were implemented and reinforced. Ongoing education on the topic (outbreak and prevention of infections related to health services) were optimized. Surveillance of all nearby patients was performed using cultures to track and identify infection with the bacteria responsible for the outbreak. Phenotypic characterization of the microorganism was carried out in the microbiology laboratory of the university hospital.

Molecular characterization of the isolates was carried out in the Microbiology Laboratory of the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso (UFMT), after registration in the National System for Ethical Assessment of Research Projects with Human Beings and approval by the Hospital Ethics Committee. Júlio Muller University.

Whole genome sequencing

The bacterial isolates were cultured in brain heart infusion broth at 37 °C overnight. DNA was extracted using proteinase K digestion followed by phenol-chloroform extraction [18]. Genomic libraries were prepared using an Illumina HiSeq 2500 system (Illumina Inc., California, USA) with coverage greater than 1000x. We based the 1000x coverage parameter on genomic analysis of whole genome sequence (WGS) of other strains with a coverage of 662x [19]. The raw data obtained were reassembled using the SPAdes v.3.10.0 algorithm in Pathosystems Resource Integration Centre assembly (PATRIC) server (<https://www.patricbrc.org/>) [36], and annotations were made using Rapid Annotation using Subsystem Server Technology (RAST) [37]. The assembled genomes

were reconstructed into scaffolds using the multi-CAR tool [38].

Bioinformatic analysis

Genomes assembly and annotation

Unicycler assembler v 0.5.0 (hybrid assembly pipeline for bacterial isolate genomes) was used for the de-novo assembly of Illumina Seq adapter free and error correction of data. Unicycler utilizes SPAdes to build a De Bruijn graph assembly utilizing an extensive variety of k-mer sizes.

Prokka 1.13.4 was used for gene prediction [21] and functional analysis to detect antimicrobial resistance genes (ARGs) were performed using ABRicate [22] with Megares [23], Ecoli_VF [24], and Virulence Factor Database (VFDB) [25].

Comparative genome analysis

BLAST Ring Image Generator (BRIG) was used to generate a circular comparative map (Figure 1) of all the bacterial isolates [26]. In addition to displaying similarity between a reference genome in the center and other query sequences as a set of concentric rings colored according to BLAST identity, BRIG can generate circular comparison images for prokaryote genomes, display multiple genome comparisons in a single image, and generate circular comparison images for other types of genomes as well.

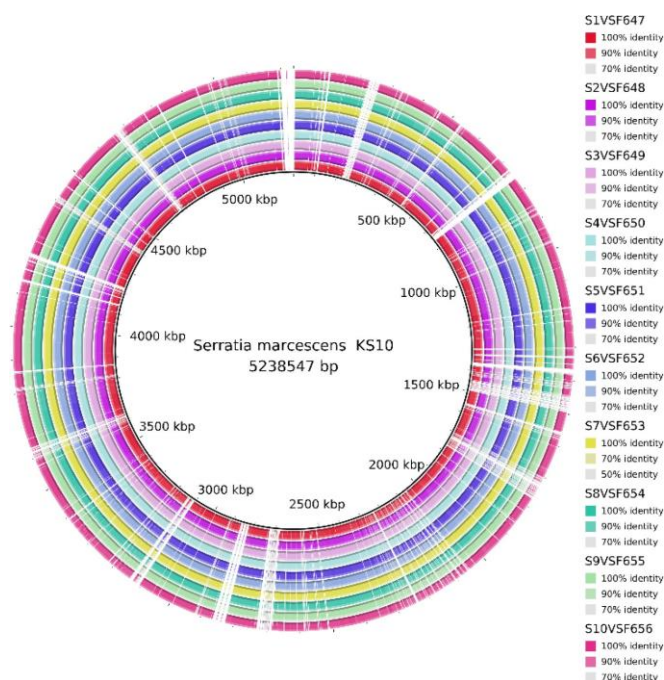
Ethics approval

The research project was approved by the Research Ethics Committee of the Júlio Muller University Hospital and registered with the National System of Ethical Evaluation of Human Research Projects (CAAE 17331119.2.0000.5541).

Results

All the patients, except those undergoing cancer treatment, were admitted to the ICU. The isolates collected from the patients were sequenced and the genomic features showed clonality based on identical coding sequences (CDS) (Table 1) probably associated

Figure 1. Comparison of sequences of multidrug-resistant *Serratia marcescens* isolates from hospitalized patients to the reference strain.



A BLAST was performed to compare the coding sequence (CDS) regions in the reference genome (*S. marcescens* KS10) and the uploaded query sequences. The inner-most slot (brown) shows CDS regions on the reference, and the outer-most slot (red) represents the core genome. The core genome slot shows regions where a BLAST hit was present between the reference and all of the

with the short time period of outbreak (12 days). Occurrence of polyclonal outbreaks have been described in hospitals in India and Spain, but over a long period from five-month to two years of investigation [27,28]. We observed the occurrence of a broad group of virulence genes, totaling nine, which were present in all the isolates. Their functions were associated with motility (*cadA*, *fliM*, *cheY*, *fliG*, and *gndA*), stress response (*gndA* and *rpoS*), pathway regulation (*rscB*), iron uptake (*entF*), and hemolysin production (*shlB*) based on the data from other confirmed bacteria and animal species [29]. These factors give bacteria the

Table 1. Genomic features of clonal multidrug-resistant *Serratia marcescens* from the outbreak among patients admitted to the intensive care unit, Cuiabá-MT, Brazil.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Contigs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bases	5017862	5022821	5022695	5022821	5022818	5022919	5022802	5022373	5022802	5022725
CDS*	4598	4602	4603	4602	4603	4603	4603	4603	4603	4602
Gene	4677	4684	4685	4684	4685	4686	4685	4685	4685	4681
rRNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
tRNA	7	80	80	80	80	81	80	80	80	77
tmRNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

CDS: coding DNA sequence.

Table 2. Virulent and resistant genes in *Serratia marcescens*.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
ARG									
AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6	AAC6
HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS
SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT	SRT
SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB	SDEB
MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI	MEXI
TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM
SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX	SDEX
SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY	SDEY
CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR	CPXAR
CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP
VIRULENCE									
rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB	rcsB
cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY	cheY
fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM	fliM
fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG	fliG
gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA	gndA
acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB	acrB
rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS	rpoS
cadA	cadA	cadA	cadA	cadA	cadA	cadA	cadA	cadA	cadA
ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88	ECS88
_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547	_3547

Source: Megares, Ecoli_vf and Vfdb. ARGs: antibiotic resistance genes; AAC6: Aminoglycoside N(6')-acetyltransferase enzyme; SRT: *Serratia marcescens* β -lactamase; TEM: β -lactamase class A; HNS, MEXI, SDEB, SDEX, SDEY, CPXAR, CRP, acrB: multidrug efflux pump resistance-nodulation-division (RND); rcsB: prodigiosin synthesis, biofilm formation and acid resistance; cheY, fliG, fliM: modulate the direction of flagellar rotation; rpoS: general response to oxidative stress; gndA: defense protein thermal shock; cadA: metal resistance protein; ECS88_3547: lipoprotein from the *NLPI* gene that provides mechanical strength and resistance to osmotic stress.

ability to colonize, infect and invade the host's immune system [30], thus contributing to an outbreak. These mechanisms are widely known in some bacterial species [29]; however, few studies address their pathogenic mechanisms in *Serratia* spp. Virulence and antibiotic resistance genes (ARG) in *S. marcescens*, from a different database (Megares, Ecoli_vf and Vfdb) are listed in Table 2.

The ARG genes were similar in all samples, except for sample1 (S1) which had no β -lactamase gene (*TEM*), as shown in the phenotypic resistance profile in Table 3. The *blaTEM* gene was previously reported in 54 *S. marcescens* isolates collected from neonatal intensive care units (NICUs) and ICUs in Brazil. Other genes identified in our research, such as *SdeB*, *SdeY*, *aac(6')*, have also been reported previously [31].

Divergent phenotypic antibiotic susceptibility was observed in nine out of ten gentamycin-sensitive isolates that also carried the *aac(6')-Ic* gene, which confers resistance to aminoglycosides [32]. However, in other studies, low resistance was observed in all isolates harboring the acyltransferase gene *aac(6')-Ic* [26,31].

The presence of genes such as phosphotransferase *aph(3')* or adenylyltransferase *aadb* in *S. marcescens* has been previously associated with resistance [33], but they were not present in our isolate. Low resistance to tigecycline has been described in many studies with inconsistent results [1,8]. In the present study, an 80% susceptibility to tigecycline was observed; however, in other studies this is disrupted by the presence of RND-type drug efflux pumps (*sdeB*, *sdeX*, *sdeY*, and *hasF*) [31,34,35].

Table 3. Patient data and the antibiotic resistance profile.

Nº	Patient age/ gender	Sample	Sensitivity	Resistance	Underlying disease	Outcome
S1	74, M	Aspirated tracheal	TG GEN	TZP, CPM, POL, IMP, ETP, MER, CIP, AMI	Neurocryptococcosis	Death
S2	84, F	Aspirated tracheal	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Acute myocardial infarction	Death
S3	60, M	Tip of catheter	GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI, TG	Adenocarcinoma of prostate	Cured
S4	63, F	Rectal swab	GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI, TG	Leprosy	Cured
S5	57, M	Pleural liquid	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Pulmonary aspergillosis	Cured
S6	71, M	Aspirated tracheal	TG	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CPI, AMI, GEN	HIV and Pneumocystosis	Death
S7	40, F	Rectal swab	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Leprosy and cholecystitis	Cured
S8	56, M	Abdominal secretion	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Diaphragmatic hernia and emergency laparotomy	Cured
S9	18, F	Synovial liquid	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Hemolytic anemia and disseminated histoplasmosis	Cured
S10	65, M	Blood	TG GEN	TZP, CPM, POL, IPM, ETP, MER, CIP, AMI	Pemphigus foliaceus and renal failure	Death

TZP: piperacilin + tazobactam; CPM: cefepime; POL: polymixin B, IPM: imipenem; ETP: ertapenem; MER: meropenem; CIP: ciprofloxacin; AMI: amikacin; TG: tigecycline; GEN: gentamycin; M: male; F: female.

Conclusions

S. marcescens is notorious for its increasing antimicrobial resistance and potential to cause outbreaks in hospital settings. Isolates of *S. marcescens* isolated from a tertiary hospital in Cuiabá, showed a multidrug-resistant phenotype that was sensitive to only two of the ten antimicrobial classes tested. *S. marcescens* genotyping proved to be a valuable tool to identify genotypic differences and genetic relatedness among the people attended, in addition to demonstrating clonality by whole genome sequencing, confirming the occurrence of an outbreak in the Tertiary Public Hospital in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

Our results indicated a diversity of virulence and resistance factors, demonstrating a variety of genetic contexts in which these genes can be inserted. Complete genome sequencing was used as a tool to characterize and confirm an outbreak of multidrug-resistant *S. marcescens* isolates, helping, among other aspects, in the typing and identification of resistance determinants. This analysis of data generated through bioinformatic tools specialized in the identification of acquired genes provides very useful information to identify important aspects of an isolate, as it brings together information about genomic characteristics and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *S. marcescens* and is also useful for future studies.

References

- Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM (2019) *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). Int J Environ Res Public Health 16: 610. doi: 10.3390/ijerph16040610.
- Milisavljevic V, Wu F, Larson E, Rubenstein D, Ross B, Drusin LM, Della-Latta P, Saiman L (2004) Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* outbreaks in two neonatal intensive care units. Infect Control Hosp Epidemiol Set 25: 719-721. doi: 10.1086/502466.
- Arslan U, Erayman I, Kirdar S, Yuksekkaya S, Cimen O, Tuncer I, Bozdogan B (2010) *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. Pediatr Int 52: 208- 212. doi: 10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x.
- Nordman P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 17: 1791-1798. doi: 10.3201/eid1710.110655.
- Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev 24: 755-791. doi: 10.1128/CMR.00017-11.
- Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, Dimopoulou D, Gkogkozotou VK, Falagas ME (2014) Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33: 1505- 1510. doi: 10.1007/s10096-014-2097-8.
- Cruz TPSS, Azevedo FKSF, Pepato MA, Sousa ATHI, Rizzo PS, Souto FJD, Nakazato L, Dutra V (2021) Outbreak of KPC- 2 producing *Serratia marcescens* MDR in a tertiary hospital in the Midwest region, Brazil. Res Soc Dev 10: 1-7. doi: 10.33448/rsd-v10i9.18078.
- Silva KE, Rossato L, Jorge S, de Oliveira NR, Kremer FS, Campos VF (2021) Three challenging cases of infections by multidrug-resistant *Serratia marcescens* in patients admitted to intensive care units. Brazilian J Microbiol 52: 1341-1345. doi: 10.1007/s42770-021-00477-4.
- de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP (2006) Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. Infect Control Hosp Epidemiol 27: 1153-1158. doi: 10.1086/508818.
- Iosifidis E, Farmaki E, Nedelkopoulou N, Tsivitanidou M, Kaperoni M, Pentsoglou V, Pournaras S, Athanasiou-Metaxa M, Roilides E (2012) Outbreak of bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric department. Am J Infect Control 40: 11-15. doi: 10.1016/j.ajic.2011.03.020.
- Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, Barth AL (2013) Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. J Med Microbiol 62: 1721-1727. doi: 10.1099/jmm.0.062141-0.
- Da Costa Guimarães AC, Almeida AC, Nicoletti AG, Vilela MA, Gales AC, de Moraes MM (2013) Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing blaKPC-2. Int J Antimicrob Agents 42: 369-370. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.05.017.
- Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Patussi Correia Sacchi F, Rodrigues-Costa F, Ramos da Silva AC, Croda J, Gales AC, Simionatto S (2015) Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. J Clin Microbiol 53: 2324-2328. doi: 10.1128/JCM.00727-15.

14. Krzysińska S, Raczkowska M, Kaznowski A (2010) Cytotoxic activity of *Serratia marcescens* clinical isolates. *Pol J Microbiol* 59: 201-205. doi: 10.33073/pjm-2010-031.
15. Perdigo J, Modesto A, Pereira AL, Neto O, Matos V, Godinho A, Phelan J, Charleston J, Spadar A, de Sessions PF, Hibberd M, Campino S, Costa A, Fernandes F, Ferreira F, Correia AB, Gonçalves L, Clark TG, Duarte A (2019) Whole-genome sequencing resolves a polyclonal outbreak by extended-spectrum beta-lactam and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese tertiary-care hospital. *Microb Genom* 7: 000349. doi: 10.1099/mgen.0.000349.
16. Ferguson D, Ryder R, Lunsford R, Dash A, Kamali A, Kimura A, Crandall J, Mukhopadhyay R, Dowless H, Ortiz N, Jue NK (2023) *Serratia marcescens* outbreak at a correctional facility: environmental sampling, laboratory analyses and genomic characterization to assess sources and persistence. *Int J Environ Res Public Health* 20: 6709. doi: 10.3390/ijerph20176709.
17. Coloma-Rivero RF, Gómez L, Alvarez F, Saitz W, Del Canto F, Céspedes S, Vidal R, Oñate AA (2020) The role of the flagellar protein FlgJ in the virulence of *Brucella abortus*. *Front Cell Infect Microbiol* 10: 178. doi: 10.3389/fcimb.2020.00178.
18. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press 1.32-1.34.
19. Ferreira LC, Maul JE, Viana MVC, de Sousa TJ, de Carvalho Azevedo VA, Roberts DP, de Souza JT (2021) Complete genome sequence of the biocontrol agent *Serratia marcescens* strain N4-5 uncovers an assembly artefact. *Braz J Microbiol* 52: 245-250. doi: 10.1007/s42770-020-00382-2.
20. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE (2017) Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13: e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
21. Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30: 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
22. Seemann T (nd) Abricate, Github. Available: <https://github.com/tseeman/abricate/>.
23. Doster E, Lakin SM, Dean CJ, Wolfe C, Young JG, Boucher C (2020) MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Res* 48: D561-D569. doi: 10.1093/nar/gkz1010.
24. Ingle DJ, Valcanis M, Kuzevski A, Tauschek M, Inouye M, Stinear T, Levine MM, Robins-Browne RM, Holt KE (2016) In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. *Microb Genom* 2: e000064. doi: 10.1099/mgen.0.000064.
25. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q (2016) VFDB: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res* 44: D694-D697. doi: 10.1093/nar/gkv1239.
26. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12: 402. doi: 10.1186/1471-2164-12-402.
27. Rohit A, Suresh Kumar D, Dhinakaran I, Joy J, Vijay Kumar D, Kumar Ballamoole K, Karunasagar I, Karola P, Dag H (2019) Whole-genome-based analysis reveals multiclonal *Serratia marcescens* outbreaks in a non-neonatal intensive care unit setting in a tertiary care hospital in India. *J Med Microbiol* 68: 616-621. doi: 10.1099/jmm.0.000947.
28. Pérez-Viso B, Hernández-García M, Ponce-Alonso M, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Del Campo R, Cantón R (2021) Characterization of carbapenemase-producing *Serratia marcescens* and whole-genome sequencing for plasmid typing in a hospital in Madrid, Spain (2016-18). *J Antimicrob Chemother* 76: 110-116. doi: 10.1093/jac/dkaa398.
29. Kurz CL, Chauvet S, Andrès E, Aurouze M, Vallet I, Michel GPF, Uh M, Celli J, Filloux A, Bentzmann S, Steinmetz I, Hoffmann JA, Finlay BB, Gorvel JP, Ferrandon D, Ewbank JJ (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J* 22: 1451-1460. doi: 10.1093/emboj/cdg159.
30. Diacovich L, Gorvel JP (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 8: 117-128. doi: 10.1038/nrmicro2295.
31. Ferreira RL, Rezende GS, Damas MSF, Oliveira-Silva M, Pitondo-Silva A, Brito MCA, Leonardez E, de Góes FR, Campanini EB, Malavazi I, da Cunha AF, Pranchevicius MDS (2020) Characterization of KPC-producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit of a Brazilian tertiary hospital. *Front Microbiol* 11: 956. doi: 10.3389/fmicb.2020.00956.
32. Yang H, Cheng J, Lifan Hu L, Zhu Y, Li J (2012) Mechanisms of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens*. *African J Microbiol Res* 6: 4427-4437. doi: 10.5897/AJMR11.1545.
33. Moradigaravand D, Boinett CJ, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J (2016) Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Res* 26: 1101-1109. doi: 10.1101/gr.205245.116.
34. 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 (2019) Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from *Serratia marcescens*, Db10. *Sci Reports* 9: 4854. doi: 10.1038/s41598-019-41237-7.
35. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Hudson S, Livermore DM, Woodford N (2020) Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime. *J Antimicrob Chemother* 65: 479-482. doi: 10.1093/jac/dkp475.
36. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19: 455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
37. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA 3rd, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F (2015) RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 10: 8365. doi: 10.1038/srep08365.
38. Chen KT, Chen CJ, Shen HT, Liu CL, Huang SH, Lu CL (2016) Multi-CAR: a tool of contig scaffolding using multiple references. *BMC Bioinformatics* 17 Suppl 17: 469. doi: 10.1186/s12859-016-1328-7.

Corresponding author

Thalita Priscila Peres Seabra da Cruz, PhD.

Graduate Program in Veterinary Sciences—Laboratory of Veterinary Microbiology and Molecular Biology, Veterinary Hospital of Federal University of Mato Grosso (Av. Fernando Correa da Costa, 2.367—Bairro: Boa Esperança. CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brazil.

Tel: +55 (65) 3615-8662

Email: thaly.prii@hotmail.com

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Isolados de *S. marcescens* isolados de um hospital terciário de Cuiabá apresentaram fenótipo multirresistente e sensível a apenas duas das dez classes de antimicrobianos testadas.
- Os genes de resistência e virulência foram semelhantes em todas os isolados, exceto para S1 que não apresentou a β -lactamase *bla*_{TEM}, embora tenha apresentado fenótipo de resistência a penicilina e cefalosporina utilizadas nos tratamentos.
- A genotipagem de *S. marcescens* mostrou-se uma ferramenta valiosa para identificar diferenças genotípicas e parentesco genético entre as amostras dos pacientes, além de demonstrar clonalidade por sequenciamento completo do genoma, confirmando a ocorrência de um surto neste Hospital Público Terciário em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.
- Esta análise de dados gerados através de ferramentas de bioinformática especializadas na identificação de genes adquiridos fornece informações muito úteis para identificar aspectos importantes de um isolado, pois reúne informações sobre características genômicas e suscetibilidade antimicrobiana em isolados clínicos de *Serratia marcescens*, contribuindo com dados que também podem ser úteis para futuros estudos.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram uma diversidade de fatores de virulência e resistência, demonstrando uma variedade de contextos genéticos nos quais esses genes podem estar inseridos. Desta forma, podemos constatar a necessidade de ampliar os estudos de virulência e resistência, principalmente para auxiliar em controles de surtos e na implementação de controle de infecção em hospitais.

REFERÊNCIAS

ADEDIRAN, T.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. K.; CALFEE, D. P.; MILLER, L. G.; NGUYEN, M. H.; MORGAN, D. J.; GOODMAN, K. E.; HITCHCOCK, S.; PINELES, L.; O'HARA, L. M. Epidemiologic and microbiologic characteristics of hospitalized patients co-colonized with multiple species of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*. US: **Oxford University Press**, v. 7, n. 10, p. ofaa386. 2020.

ALVES, A. P; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev AMRIGS**, v. 57, n. 3, p.213-238. 2013.

AMIN M, NAVIDIFAR T, SALEH SHOOSHTARI F, GOODARZI H. Association of the genes encoding Metallo- β -Lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Infect Drug Resist.**, v.12, p.1171- 1180. 2019. doi.org/10.2147/IDR.S196575

ANDERSON, B. NICHOLAS S, SPRAGUE B, CAMPOS J, SHORT B, SINGH N. Molecular and descriptive epidemiology of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitalized infants. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 3, p. 250-255, 2008. doi: 10.1086/527513.

ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017.

BAKKIYARAJ, D.; SIVASANKAR, C.; PANDIAN, S. K. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3089–3094. 2012.

BANZHAF M, YAU HC, VERHEUL J, LODGE A, KRITIKOS G, MATEUS A, CORDIER B, HOV AK, STEIN F, WARTEL M, PAZOS M, SOLOVYOVA AS, BREUKINK E, VAN TEEFFELLEN S, SAVITSKI MM, DEN BLAAUWEN T, TYPAS A, VOLLMER W. Outer membrane lipoprotein Nlpl scaffolds peptidoglycan hydrolases within multi-enzyme complexes in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 39, n.5 p.e102246. 2020. doi: 10.15252/embj.2019102246.

BARON S, EISENBACH M. CheY acetylation is required for ordinary adaptation time in *Escherichia coli* chemotaxis. **FEBS Lett.** v. 591, n. 13, p.1958-1965. 2017. doi: 10.1002/1873-3468.12699

BARTELS, D. B., SHWAB F, GEFFERS C, POETS CF, GASTMEIER P. Nosocomial infection in small for gestational age newborns with birth weight <1500 g: a multicentre analysis. **Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition**, v. 92, n. 6, p. F449–F453, 2007. doi: 10.1136/adc.2006.114504.

BARTH, A. L., LUTZ L., BARROS E., MACHADO, A. Resistência Bacteriana. In: BARROS, E.;MACHADO, A., et al (Ed.). **Antimicrobianos: consulta rápida**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BENTLEY DR, BALASUBRAMANIAN S, SWERDLOW HP, SMITH GP, MILTON J, BROWN CG, HALL KP, EVERS DJ, BARNES CL, BIGNELL HR, BOUTELL JM, BRYANT J, CARTER RJ, KEIRA CHEETHAM R, COX AJ, ELLIS DJ, FLATBUSH MR,

GORMLEY NA, HUMPHRAY SJ, IRVING LJ, KARBELASHVILI MS, KIRK SM, LI H, LIU X, MAISINGER KS, MURRAY LJ, OBRADOVIC B, OST T, PARKINSON ML, PRATT MR, RASOLONJATOVO IM, REED MT, RIGATTI R, RODIGHIERO C, ROSS MT, SABOT A, SANKAR SV, SCALLY A, SCHROTH GP, SMITH ME, SMITH VP, SPIRIDOU A, TORRANCE PE, TZONEV SS, VERMAAS EH, WALTER K, WU X, ZHANG L, ALAM MD, ANASTASI C, ANIEBO IC, BAILEY DM, BANCARZ IR, BANERJEE S, BARBOUR SG, BAYBAYAN PA, BENOIT VA, BENSON KF, BEVIS C, BLACK PJ, BOODHUN A, BRENNAN JS, BRIDGHAM JA, BROWN RC, BROWN AA, BUERMANN DH, BUNDU AA, BURROWS JC, CARTER NP, CASTILLO N, CHIARA E CATENAZZI M, CHANG S, NEIL COOLEY R, CRAKE NR, DADA OO, DIAKOUMAKOS KD, DOMINGUEZ-FERNANDEZ B, EARNSHAW DJ, EGBUJOR UC, ELMORE DW, ETCHIN SS, EWAN MR, FEDURCO M, FRASER LJ, FUENTES FAJARDO KV, SCOTT FUREY W, GEORGE D, GIETZEN KJ, GODDARD CP, GOLDA GS, GRANIERI PA, GREEN DE, GUSTAFSON DL, HANSEN NF, HARNISH K, HAUDENSCHILD CD, HEYER NI, HIMS MM, HO JT, HORGAN AM, HOSCHLER K, HURWITZ S, IVANOV DV, JOHNSON MQ, JAMES T, HUW JONES TA, KANG GD, KERELSKA TH, KERSEY AD, KHREBTUKOVA I, KINDWALL AP, KINGSBURY Z, KOKKO-GONZALES PI, KUMAR A, LAURENT MA, LAWLEY CT, LEE SE, LEE X, LIAO AK, LOCH JA, LOK M, LUO S, MAMMEN RM, MARTIN JW, MCCAULEY PG, MCNITT P, MEHTA P, MOON KW, MULLENS JW, NEWINGTON T, NING Z, LING NG B, NOVO SM, O'NEILL MJ, OSBORNE MA, OSNOWSKI A, OSTADAN O, PARASCHOS LL, PICKERING L, PIKE AC, PIKE AC, CHRIS PINKARD D, PLISKIN DP, PODHASKY J, QUIJANO VJ, RACZY C, RAE VH, RAWLINGS SR, CHIVA RODRIGUEZ A, ROE PM, ROGERS J, ROBERT BACIGALUPO MC, ROMANOV N, ROMIEU A, ROTH RK, ROURKE NJ, RUEDIGER ST, RUSMAN E, SANCHES-KUIPER RM, SCHENKER MR, SEOANE JM, SHAW RJ, SHIVER MK, SHORT SW, SIZTO NL, SLUIS JP, SMITH MA, ERNEST SOHNA SOHNA J, SPENCE EJ, STEVENS K, SUTTON N, SZAJKOWSKI L, TREGIDGO CL, TURCATTI G, VANDEVONDELE S, VERHOVSKY Y, VIRK SM, WAKELIN S, WALCOTT GC, WANG J, WORSLEY GJ, YAN J, YAU L, ZUERLEIN M, ROGERS J, MULLIKIN JC, HURLES ME, MCCOOKE NJ, WEST JS, OAKS FL, LUNDBERG PL, KLENERMAN D, DURBIN R, SMITH AJ. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature.**, v. 456, n. 7218, p. 53-59. 2008. doi: 10.1038/nature07517.

BERGSTRÖM S, NORLANDER L, NORQVIST A, NORMARK S: Contribution of a TEM-1-like beta-lactamase to penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, p. 618–623. 1978.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BHARATHAM N, BHOWMIK P, AOKI M, OKADA U, SHARMA S, YAMASHITA E, SHANBHAG AP, RAJAGOPAL S, THOMAS T, SARMA M, NARJARI R, NAGARAJ S, RAMACHANDRAN V, KATAGIHALLIMATH N, DATTA S, MURAKAMI S. Structure and function relationship of Oqx B efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. **Nat Commun.** v. 13, n. 12, p. 5400. 2021 doi: 10.1038/s41467-021-25679-0.

BLAIR, J. M. A., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., OGBOLU, D. O., AND PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbio.**, n. 13, p. 42–51. 2014. doi: 10.1038/nrmicro3380

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases.

Antimicrob Agents Chemother, v.54, n.3, p.969-76, 2010.

CARRÈR A, POIREL L, YILMAZ M, AKAN OA, FERIHA C, CUZON G, MATAR G, HONDERLICK P, NORDMANN P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 54, p.1369–373. 2010. doi:10.1128/AAC.01312-09.

CASOLARI, C. PECORARI M, DELLA CASA E, CATTANI S, VENTURELLI C, FABIO G, TAGLIAZUCCHI S, SERPINI GF, MIGALDI M, MARCHEGIANO P, RUMPIANESI F, FERRARI F. *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: Two long-term multiclonal outbreaks in a 10-year observational study. **New Microbiologica**, v. 36, n. 4, p. 373–383, 2013.

CHIBABHAI, V.; NANA, T.; BOSMAN, N.; THOMAS, T.; LOWMAN, W. Were all carbapenemases created equal? Treatment of NDM-producing extensively drug-resistant *Enterobacteriaceae*: a case report and literature review. **Infection** v.46, n.1, p.1–13. 2018. doi:10.1007/s15010-017-1070-8

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *blaKPC* gene mobilization. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 55, p.5370–5373, 2011. doi: 10.1128/AAC.05202-11.

DARWICH, L.; VIDAL, A.; SEMINATI, C.; ALBAMONTE, A.; CASADO, A.; LOPEZ, F.; MOLINA-LOPEZ, R. A.; MIGURA-GARCIA, L. High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and emergence of OXA-48 producing *Enterobacteriales* in wildlife in Catalonia. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p.1-15. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210686>.

PATERSON DL, DOI Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**. v. 45, n 9, p. 1179-1181. 2007. doi: 10.1086/522287.

DAWCZYNSKI, K.; PROQUITTÉ, H.; ROEDEL, J.; EDEL, B.; PFEIFER, Y.; HOYE, H.; DOBERMANN H, HAGEL S, PLETZ MW. Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the neonatal intensive care unit, Jena, Germany, 2013-2014.. **Infection**, v. 44, n. 6, p. 739–746, 2016. doi: 10.1007/s15010-016-0922-y

DAWCZYNSKI, K.; Proquitté, H.; Roedel, J.; Edel, B.; Pfeifer, Y.; Hoyer, H.; et al. Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the neonatal intensive care . **Infection**, v. 44, n. 6, p. 739–746, 2016.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 365-367. 2010.

DIAS, MF, DE CASTRO, GM, DE PAIVA, MC et al. Explorando a resistência a antibióticos em cassetes de integrons ambientais através do sequenciamento profundo de amplicons intl-attC . *Braz J Microbiol* 52 , 363-372 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00409-8>

DIDELOT X, BOWDEN R, WILSON DJ, PETO TEA, CROOK DW. Transforming clinical

microbiology with bacterial genome sequencing. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 9, p. 601-12, 2012. doi: 10.1038/nrg3226

DING, Y.; WANG, Y.; HSIA, Y.; SHARLAND, M. HEATH, P. T. Systematic review of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* causing neonatal sepsis in China. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2019.

DUBOUIX A, ROQUES C, SEGONDS C, JEANNOT MJ, MALAVAUD S, DAUDE S, CHABANON G, MARTY N. Epidemiological investigation of a *Serratia liquefaciens* outbreak in a neurosurgery department. **J. Hosp. Infect.** 2005; 60(1):8–13. doi: 10.1016/j.jhin.2004.09.029.

DUCRET V, GONZALEZ MR, LEONI S, VALENTINI M, PERRON K. The CzcCBA Efflux System Requires the CadA P-Type ATPase for Timely Expression Upon Zinc Excess in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol.** 2020 May 15;11:911. doi: 10.3389/fmicb.2020.00911. PMID: 32477311; PMCID: PMC7242495.

DURANTE-MANGONI E, GRAMMATIKOS A, UTILI R, FALAGAS ME. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 33, n. 3, p. 201- 205. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>

DURANTE-MANGONI, E.; ANDINI, R.; ZAMPINO, R. Management of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 8, p. 943-950, 2019.

Escherichia coli virulence factors

(ecoli_VF_collection/source/ecoli_VF_collection_description.tsv. Disponivel em: https://github.com/aleimba/ecoli_VF_collection/blob/master/source/ecoli_VF_collection_description.tsv

EL-GAMAL, M. I.; BRAHIM, I.; HISHAM, N.; ALADDIN, R.; MOHAMMED, H.; BAHAAELDIN, A. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European journal of medicinal chemistry**, v. 131, p. 185-195, 2017.

ENGELHART, S.; SABOROWSKI, F.; KRAKAU, M.; SCHERHOLZ-SCHLÖSSER, G.; HEYER, I.; EXNER, M. Severe *Serratia liquefaciens* sepsis following vitaminC infusion treatment by a naturopathic practitioner. **J. Clin. Microbiol.** n. 41, p. 3986–3988. 2003. doi: 10.1128/JCM.41.8.3986-3988.2003.

European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: **ECDC**. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.

FIEBIG L, KOHL TA, POPOVICI O, MÜHLENFELD M, INDRA A, HOMORODEAN D, CHIOTAN D, RICHTER E, RÜSCH-GERDES S, SCHMIDGRUBER B, BECKERT P, HAUER B, NIEMANN S, ALLERBERGER F, HAAS W. 2017. A joint cross-border investigation of a cluster of multidrug-resistant tuberculosis in Austria, Romania and Germany in 2014 using classic, genotyping and whole genome sequencing methods: lessons learnt. **Euro Surveill** 22:30439. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.2.30439

FOURNIER, J. B. et al. *Serratia marcescens* Bullous Cellulitis in a splenectomized patient: A case report and review of the literature. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 15, n. 2, p. 161–168, 2016.

FOX JG, BEAUCAGE CM, FOLTA CA, THORNTON GW. Nosocomial transmission of *Serratia marcescens* in a veterinary hospital due to contamination by benzalkonium chloride. **J Clin Microbiol.** 1981 Aug;14(2):157-60. doi: 10.1128/jcm.14.2.157-160. 1981.

FRANCHINI D, PACI S, CICCARELLI S, VALASTRO C, GRECO G, DI BELLO A. Chondroblastic Osteosarcoma Associated with Previous Chronic Osteomyelitis Caused by *Serratia liquefaciens* in a German Shepherd Dog. **Vet Sci.** v. 9, n. 3, p.96. 2022. doi: 10.3390/vetsci9030096.

FRANK WOLF, M.; ABU SHQARA, R.; NASKOVICA, K.; ZILBERFARB, I. A.; SGAYER, I.; GLIKMAN, D.; RECHNITZER, H.; SHEFFER, V.F.; BORNSTEIN, J. Vertical Transmission of Extended-Spectrum, Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* during Preterm Delivery: A Prospective Study. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 506, 2021.

FRUTOS, M.; LÓPEZ-URRUTIA, L.; DOMÍNGUEZ-GIL, M.; ARIAS, M.; MUÑOZ-BELLIDO, J. L.; EIROS, J. M.; RAMOS, C. *Serratia marcescens* outbreak due to contaminated 2% aqueous chlorhexidine. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica** (English ed.), v. 35, n. 10, p. 624-629. 2017.

GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. D. The Genus *Serratia*. in **Prokaryotes** (eds. Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer & Erko Stackebrandt), v. 6, p.219–244. 2006.

GUPTA, N.; HOCEVAR, S. N.; MOULTON-MEISSNER, H. A.; STEVENS, K. M.; MCINTYRE, M. G.; JENSEN, B.; KUCHAR, D. T.; NOBLE-WANG, J. A.; SCHNATZ, R. G.; BECKER, S.C.; KASTANGO, E. S.; SHEHAB, N.; KALLEN, A. J. Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. **Clin Infect Dis.**, v. 59, n. 1, p. 1–8. 2014.

HERTLE, R. (2000) *Serratia* type pore forming toxins. **Curr. Protein Pept. Sci.** v.1, p. 75-89.

HURST MRH, GLARE TR, JACKSON TA. Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. **J. Bacteriol.**v. 186, p. 5116–5128. 2004. doi: 10.1128/JB.186.15.5116-5128.2004

ICGEN B, YILMAZ F. Design a cadA-targeted DNA probe for screening of potential bacterial cadmium biosorbents. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 6, p. 5743-52. 2016. doi: 10.1007/s11356-015-5810-y.

ILLUMINA. 2017. Introduction to Whole-Genome Sequencing. Disponível em: <<http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/whole-genomesequencing.html> > acesso em: 08/11/2022.

Interagency Coordination Group (IACG) on Antimicrobial Resistance (2019), 'No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections'. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en>

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a

- regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 672–681. 2013.
- KAIRALA, R. O. M.; SOUZA, L. V. M. ; CESAR, G. M. ; FAVORETTO, S. M. ; LACRETA, A. C. C. . Co-infecção por *Serratia marcescens* e *macrorhabdus ornithogaster* em canário belga (*Serinus canaria*). XXXIV Congresso de Iniciação Científica da UFLA. 2021.
- KARKEY A, JOSHI N, CHALISE S, JOSHI S, SHRESTHA S, THI NGUYEN TN, DONGOL S, BASNYAT B, BAKER S, BOINETT CJ. Outbreaks of *Serratia marcescens* and *Serratia rubidaea* bacteremia in a central Kathmandu hospital following the 2015 earthquakes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2018;112:467–472. doi: 10.1093/trstmh/try077.
- KHANNA A, KHANNA M, AGGARWAL A. *Serratia marcescens* - a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. **J. Clin. Diagn. Res.** v. 7, p. 243–246. 2013.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; KONEMAN, E.W.; ALLE, N S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KUMUDUNIE, W. G. M.; WIJESOORIYA, L. I.; NAMALIE, K. D.; SUNIL-CHANDRA, N. P.; WIJAYASINGHE, Y. S. Epidemiology of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in Sri Lanka: First evidence of blaKPC harboring *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, p. 1330-1335, 2020.
- KUNSTÝŘ, I., POSPÍŠIL, J. Penetration of *Serratia marcescens* from the intestine into the organism of irradiated dogs. **Folia Microbiol**, v. 7, p. 83-87. 1962. <https://doi.org/10.1007/BF02926336>
- LAM KH, LAM WW, WONG JY, CHAN LC, KOTAKA M, LING TK, JIN DY, OTTEMANN KM, AU SW. Structural basis of FlhG-FlhM interaction in *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol**. v. 88, n. 4, p.798-812. 2013. doi: 10.1111/mmi.12222.
- LAVILLA LERMA L, BENOMAR N, VALENZUELA AS, CASADO MUÑOZ MDEL C, GÁLVEZ A, ABRIOUEL H. Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. **Food Microbiol.** v. ;44, p. 249-57. 2014. doi: 10.1016/j.fm.2014.06.009.
- LAZZARO M, FELDMAN MF, GARCÍA VÉSCOV E. A Transcriptional Regulatory Mechanism Finely Tunes the Firing of Type VI Secretion System in Response to Bacterial Enemies. **mBio**. v. 8, n. 4, p.e00559-17. 2017. doi: 10.1128/mBio.00559- 17.
- LAZZARO, M. 2019. Factores de virulencia de *Serratia marcescens*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario - Argentina.
- LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 4, p. 695-703, 1992.

LI, X. Z.; PLESIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LI, X.; QUAN, J., KE, H., WU, W., FENG, Y., YU, Y., JIANG, Y. Emergence of a KPC. Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Widespread ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone in China. **Frontiers in microbiology**, p. 2419, 2021.

LIANG, W.; XIE Y.; XIONG W.; TANG Y.; LI G.; JIANG X. and LU Y. Anti-restriction Protein, KlcAHS, Promotes Dissemination of Carbapenem Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

LIEBERT CA, HALL RM, SUMMERS AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. **Microbiol Mol Biol Rev**. 1999 Sep;63(3):507-22. doi: 10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999.

LIMA, K. V. B.; CARVALHO, R.G.C.; CARNEIRO, C.R.S.; LIMA, L.S.; SOUSA, C.O.; LOUREIRO, E.C.B.; SÁ, L.L.C.; BASTOS, F.C. Outbreak of neonatal infection by an endemic clone of *Serratia marcescens*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 106–109, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100024>

LIU CJ, LIN CT, CHIANG JD, LIN CY, TAY YX, FAN LC, PENG KN, LIN CH, PENG HL. RcsB regulation of the YfdX-mediated acid stress response in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. **PLoS One**. v. 14, n. 2, p. e0212909. 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0212909.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28–S36. 2017.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; PATERSON, 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. 268-281, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MAHLEN SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 24, p 755–791. 2011. doi: 10.1128/CMR.00017-11.

MARTINEAU C, LI X, LALANCETTE C, PERREAULT T, FOURNIER E, TREMBLAY J, GONZALES M, YERGEAU É, QUACH C. *Serratia marcescens* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit: New Insights from Next-Generation Sequencing Applications. **J Clin Microbiol**. v. 56, n. 9, p.e00235-18. 2018. doi: 10.1128/JCM.00235-18

MELO, GLADYS VILLAS BÔAS DO PRADO *Serratia marcescens* resistente a carbapenêmicos: epidemiologia, avaliação genotípica e fenotípica / Gladys Villas Bôas do Prado Melo. -- São Paulo, 2019. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

MENEZES E A; CEZAFAR FC; SENA AMS; DE PAULA RMAV; CUNHA FA. Frequência de *Serratia* sp em Infecções Urinárias de pacientes internados na Santa

Casa de Misericórdia em Fortaleza. 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(1) DOI:10.1590/S0037-86822004000100020

MERLINO, C. P. Bartolomeo Bizio's letter to the most eminent priest, Angelo Bellani, concerning the phenomenon of the red-colored polenta [translated from the Italian]. **J. Bacteriol.** 9 , 527-543 (1924).

MOLAND, E. S. et al. Plasmid-mediated, carbapenemhydrolysing β -lactamase, KPC- 2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 3, p. 711-4, 2003.

MORADIGARAVAND D, BOINETT CJ, MARTIN V, PEACOCK SJ, PARKHILL J. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. **Genome Res.**26:1101–1109. 2016. doi: 10.1101/gr.205245.116.

MORRILL, H. J.; POGUE, J. M.; KAYE, K. S.; LAPLANTE, K. L. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2015. doi: 10.1093/ofid/ofv050

MURDOCH SL, MURDOCH SL, TRUNK K, ENGLISH G, FRITSCH MJ, POURKARIMI E, COULTHURST SJ. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. **J Bacteriol.** 2011. v. 193, p. 6057–6069. doi: 10.1128/JB.05671-11.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948.

MUYLDERMANS A, CROMBÉ F, BOSMANS P, COOLS F, PIÉRARD D, WYBO I. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit and the potential of whole-genome sequencing. **J Hosp Infect.** 2021 May;111:148-154. doi: 10.1016/j.jhin.2021.02.006.

NADON C, VAN WALLE I, GERNER-SMIDT P, CAMPOS J, CHINEN I, CONCEPCION-ACEVEDO J, GILPIN B, SMITH AM, MAN KAM K, PEREZ E, TREES E, KUBOTA K, TAKKINEN J, NIELSEN EM, CARLETON H, FWD-NEXT Expert Panel. 2017. PulseNet International: vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. **Euro Surveill** 22:30544. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

NICHOLS, R. J. et al. Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell*, v. 144, n. 1, p. 143-56, 2011.

NISHINO K, HAYASHI-NISHINO M, YAMAGUCHI A. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing multidrug efflux genes *acrEF*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2009 Aug;53(8):3541-3. doi: 10.1128/AAC.00371-09. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506059; PMCID: PMC2715579.

NISHINO K, SENDA Y, YAMAGUCHI A. CRP regulator modulates multidrug resistance of *Escherichia coli* by repressing the *mdtEF* multidrug efflux genes. **J**

Antibiot (Tokyo). 2008 Mar;61(3):120-7. doi: 10.1038/ja.2008.120. PMID: 18503189.

NISHINO K, YAMAGUCHI A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** 2004 Mar;186(5):1423-9. doi: 10.1128/JB.186.5.1423-1429.2004. PMID: 14973023; PMCID: PMC344412.

NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 20, p. 5803-12, 2001.

NODARI, C.S. Avaliação dos mecanismos adquiridos de Resistência a Antimicrobianos em Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases por sequenciamento de nova geração / Carolina Silva Nodari, - - 2016. 125f.

NORDMAN, P; NAAS, T; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 10, p.1791-1798, 2011.

OMOREGIE, R.; EGBE, C. A.; IGBARUMAH, I. O.; OGEFERE, H.; OKORIE E. Prevalence and etiologic agents of female reproductive tract infection among in-patients and out-patients of a tertiary hospital in Benin city, Nigeria. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 10, p. 473-477. 2010

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), Antibiotic resistance, July 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

PAN X, TANG M, YOU J, LIU F, SUN C, OSIRE T, FU W, YI G, YANG T, YANG S-T, RAO Z. 2021. Regulator RcsB controls prodigiosin synthesis and various cellular processes in *Serratia marcescens* JNB5-1. **Appl Environ Microbiol** 87:e02052- 20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02052-20>.

PARK, Y.J.; JIN, K. Y.; KIM, S.-I.; LEE, K.; ARAKAWA, Y. Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A β -lactamase LAP-1. **Ann. Clin. Lab. Sci**, v.39, p. 55–59, 2009.

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

PICÃO, R. C.; ANDRADE, S. S.; NICOLETTI, A. G.; CAMPANA, E. H.; MORAES, G. C.; MENDES, R. E.; GALES, A. C. Metallo--Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2028–2037. 2008.

PICCIRILLI, A.; POMPILIO, A.; ROSSI, L.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; ROSATELLI, G.; PERILLI, M.; BONAVENTURA, G. D. Identification of CTX-M-15 and CTX-M-27 in Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Three Rivers Running in Central Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1-9. 2019. DOI: 10.1089/mdr.2019.0016

PIDDOCK LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nat Rev Microbiol.** 2006 Aug;4(8):629-36. doi: 10.1038/nrmicro1464

PITOUT JD, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrob Agents Chemother.** 2015 Oct;59(10):5873-84. doi: 10.1128/AAC.01019-15. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26169401; PMCID: PMC4576115.

POIREL L, HERITIER C, TOLUN V, NORDMANN P Emergência de resistência mediada por oxacilinase ao imipenem em *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** . 2004; 48 : 15–22 10.1128 / AAC.48.1.15-22.2004

POLILLI E.; PARRUTI G.; FAZII P.; D'ANTONIO D.; PALMIERI D.; D'INCECCO C.; MANGIFESTA A.; GAROFALO G.; DEL DUCA L.; D'AMARIO C.; SCIMIA M.; CORTESI V.; FORTUNATO V. Rapidly controlled outbreak of *Serratia marcescens* infection/colonisations in a neonatal intensive care unit, Pescara General Hospital, Pescara, Italy, April 2011. **Euro Surveill.** V. 16, n. 24. p. 1-3. 2011.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and global health**, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

QUEZADA-AGUILUZ, M., LINCOPAN, N., CERDEIRA, L., FUGA, B., SILVA, F., BARRERA, B., et ai. (2020). Projeto de sequência do genoma de uma cepa de *Serratia marcescens* coprodutora de KPC-2 e SRT-2 multirresistente isolada de um paciente hospitalizado no Chile. **J. Globo. Antimicrobiano. Resistir.** 21, 1-2. doi: 10.1016/j.jgar.2020.02.004

RABINOWITZ, P.M.; KOCK, R., KACHANI, M.; KUNKEL, R.; THOMAS, J.; GILBERT, J.; RUBIN, C. Toward proof of concept of a one health approach to disease prediction and control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n.;12, 2013. doi: 10.3201/eid1912.130265

RAMIREZ MS, NIKOLAIDIS N, TOLMASKY ME (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Front Microbiol.* 17(4):121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>

REGEV-YOCHAY, G. et al. Sink traps as the source of transmission of OXA-48–producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 39, n. 11, p. 1307–1315, 4 nov. 2018.

REQUENA, D.; VÁSQUEZ, Y.; GIL, A.; CEDEÑO, J.; CHABIN, M.; DELGADO, E.; DIAS, D. C.; SANTOS, J. D. Detección fenotípica y genotípica de la producción de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC en enterobacterias aisladas en un laboratorio clínico en Maracay, Venezuela. **Revista chilena de infectología**, v. 38, n. 2, p. 197-203, 2021.

REVEZ J, ZHANG J, SCHOTT T, KIVISTÖ R, ROSSI M, HÄNNINEN ML. 2014. Genomic variation between *Campylobacter jejuni* isolates associated with milk-borne-disease outbreaks. **J Clin Microbiol** 52:2782–2786. doi: 10.1128/JCM.00931-14.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALDC, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing

isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol.** 2013 Nov;62(Pt 11):1721-1727. doi: 10.1099/jmm.0.062141-0. Epub 2013 Sep 2. PMID: 24000225.

RITTER AC, BACCIU D, SANTI L, SILVA WO, VAINSTEIN MH, RUBINO S, UZZAU S, TONDO EC. Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in southern Brazil. **J Food Prot.** 2012 Mar;75(3):437-42. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-286. PMID: 22410215.

RODRÍGUEZ-SEGURA Z, CHEN J, VILLALOBOS FJ, GILL S, NUÑEZ-VALDEZ ME. The lipopolysaccharide biosynthesis core of the Mexican pathogenic strain *Serratia entomophila* is associated with toxicity to larvae of *Phyllophaga blanchardi*. **J. Invertebr. Pathol.**;110:24–32. 2012. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.008.

ROSSOLINI G. M.; ARENA F.; PECILE P.; POLLINI S. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 56-60, 2014.

SABAT AJ, BUDIMIR A, NASHEV D, SÁ-LEÃO R, VAN DIJL JM, LAURENT F, GRUNDMANN H, FRIEDRICH AW, ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill** 18(4):20380. doi: 10.2807/ese.18.04.20380-en.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual 3 ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5: 65–5.67. 2004.

SANDNER-MIRANDA, L., VINUESA, P., SOBERÓN-CHÁVEZ, G., AND MORALES-ESPINOSA, R. (2016). Complete genome sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a nonpigmented multidrug-resistant strain isolated from a Mexican patient with obstructive pulmonary disease. **Genome Announc.** 4:e01417-15. doi: 10.1128/genomeA.01417-15

SANTOS H.F., FLÔRES M.L., LARA V.M., SÁ M.F., BATTISTI L. & LOVATO L.T. Cloacal microbiota identification and evaluation of the antimicrobial resistance in captive cracids from Rio Grande do Sul, Brazil, **Pesq. Vet. Bras.** 30(12):1077-1082. 2010.

SILVA, J.; RANNIERY, T.; MARÇAL, J. TRANSBORDAMENTO (ZONÓTICO) OU A DIVERSIDADE CONTAMINADA DAS CIÊNCIAS. 2021. Interculturalidade e transdisciplinaridade: “o que a Biologia tem a ver com isso?” p. 21-36. doi: 10.29388/978-65-86678-66-6-f.21-36.

SMOLDERS D., HENDRIKS B., ROGIERS P., MUL M., GORDTS B. Acetic acid as a decontamination method for ICU sink drains colonized by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and its effect on CPE infections. **J Hosp Infect.** 2019; 102 : 82-88

SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2022 Aug 19];30(14):2068–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24642063/>

SEIBERT, G.; HORNER, R.; HOLZSCHUH, M.; RIGHI, R.A.; FORNO, N.L.F.D.; SALLA, A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein (São Paulo)**, v.12, n.3,

p.282-286, 2014.

SEKI, L M. Caracterização de Genes de Resistência aos Beta-lactâmicos e Polimorfismo Genético em Cepas da Família *Enterobacteriaceae* isoladas de hemocultura em hospitais do Rio de Janeiro / Liliane Miyuki Seki.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012. 132 f., il.tab. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2012.

SERWECIŃSKA, L. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. **Water**, v. 12, n. 12, p. 3313, 2020.

SHAFTOE S. *Serratia marcescens* septicaemia in a neonatal Arabian foal. **Equine Vet J**. 1984 Jul;16(4):389-92. doi: 10.1111/j.2042-3306.1984.tb01952.x.

SHAIKH S, FATIMA J, SHAKIL S, RIZVI SM, KAMAL MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi J Biol Sci**. 2015;22(1):90-101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002

SHANKS, R. M. Q., DAVRA, V. R., ROMANOWSKI, E. G., BROTHERS, K. M., STELLA, N. A., SHANKS, R. M. Q., DAVRA, V. R., ROMANOWSKI, E. G., BROTHERS, K. M., STELLA, N. A., GODBOLEY, D., et al. (2013). An eye to a kill: using predatory bacteria to control Gram-negative pathogens associated with ocular infections. **PLoS One** 8:e66723. doi: 10.1371/journal.pone.0066723

SHIRSHIKOVA TV, SIERRA-BAKHSHI CG, KAMALETDINOVA LK, MATROSOVA LE, KHAIBPOVA NN, EVTUGYN VG, KHILYAS IV, DANILOVA IV, MARDANOVA AM, SHARIPOVA MR, BOGOMOLNAYA LM. The ABC-Type Efflux Pump MacAB Is Involved in Protection of *Serratia marcescens* against Aminoglycoside Antibiotics, Polymyxins, and Oxidative Stress. **mSphere**. 2021 Mar 10;6(2):e00033-21. doi: 10.1128/mSphere.00033-21.

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**, v.48, n.2, p. 91-99. 2012.

SRINIVASAN, VB E RAJAMOHAN, G. (2019). Análise do genoma de *Serratia marcescens* positivo para urease , co-produzindo SRT-2 e AAC(6')-Ic com bombas de efluxo multidrogas para resistência antimicrobiana. **Genomics** 111, 653-660. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.04.001

SU XZ, CHEN J, MIZUSHIMA T, KURODA T, TSUCHIYA T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005 Oct;49(10):4362-4. doi: 10.1128/AAC.49.10.4362-4364.2005.

SU, W.Q.; ZHU, Y.Q.; DENG, N.M.; LI, L. Imipenem-resistance in *Serratia marcescens* is mediated by plasmid expression of KPC-2. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. V. 21, p. 1690-1694. 2017.

SUBRAMANIAM, G.; GIRISH, M. Antibiotic resistance a cause for reemergence of infections. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 11, p. 937-944, 2020.

SULAVIK, M. C. et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1126-36, 2001.

Sun J., Deng Z., Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 17 October 2014, 453: (2): 254-267.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; OUELLETTE, M.; OUTTERSON, K.; PATEL, J.; CAVALERI M, COX, E. M.; HOUCHENS, C. R.; GRAYSON, M. L.; HANSEN, P.; SINGH, N.; THEURETZBACHER, U.; MAGRINI, N.; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

TRACY M., RYAN L., SAMARASEKARA H. LEROI M., POLKINGHORNE A. BRANLEY J. Removal of sinks and bathing changes to control multidrug-resistant Gram-negative bacteria in a neonatal intensive care unit: a retrospective investigation. **J Hosp Infect.**; 104: 508-510, 2020.

TUON FF, CORDOVA K, DARIO TM, NUNES LS, BARTH AL, MARTINS AF. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a university hospital. **American journal of infection control**, v. 45, n. 6, p. 700–702, 2017.

TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P. T.; DAIKOS, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.05035-11>.

VAN DUIN, D.; DOI, Y. Commentary: Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Are We at the End of the Road? **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3116-3117, 2015.

VAN HOEK, A. H., MEVIUS, D., GUERRA, B., MULLANY, P., ROBERTS, A. P., ANDAARTS, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Front. Microbiol.** 2:203. doi: 10.3389/fmicb.2011.002037

VAN LOON, K.; VOOR, A. F.; VOS, M. C. A systematic review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, 2018.

VETTER, L., SCHUEPFER, G., KUSTER, S. P., AND ROSSI, M. (2016). A hospital-wide outbreak of *Serratia marcescens*, and Ishikawa's "Fishbone" analysis to support outbreak control. **Qual. Manag. Health Care** 25, 1–7. doi: 10.1097/QMH.0000000000000078

VETTING MW, PARK CH, HEGDE SS, JACOBY GA, HOOPER DC, BLANCHARD JS. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. **Biochemistry**. 2008 Sep 16;47(37):9825-35. doi: 10.1021/bi800664x. Epub 2008

Aug 19. PMID: 18710261; PMCID: PMC2855648.

VIVAS, R.; DOLABELLA, S. S.; BARBOSA, A. A. T.; JAIN, S. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and New Delhi metallo-beta-lactamase- positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**. 2007 Sep;60(3):470-82. doi: 10.1093/jac/dkm226. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17595289.

WANG, S.; ZHAO, S.; XIAO, S.; F. GU, LIU, Q.; TANG, J.; GUO, X.; NI, Y.; HAN, L. Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. **PLoS One**, n.11, n.1, 2016.

WEATHERSPOON-GRIFFIN N, YANG D, KONG W, HUA Z, SHI Y. The CpxR/CpxA two-component regulatory system up-regulates the multidrug resistance cascade to facilitate *Escherichia coli* resistance to a model antimicrobial peptide. **J Biol Chem**. 2014 Nov 21;289(47):32571-82. 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.565762.

WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Comput Biol** [Internet]. 19;13(6). 2017.

WILKINS RJ. *Serratia marcescens* septicaemia in the dog. **J Small Anim Pract**. Apr;14(4):205-15. 1973. doi: 10.1111/j.1748-5827.1973.tb06918.x.

WILLIAMS DJ, GRIMONT PAD, CAZARES A, GRIMONT F, AGERON E, PETTIGREW KA, CAZARES D, NJAMKEPO E, WEILL FX, HEINZ E, HOLDEN MTG, THOMSON NR, COULTHURST SJ. The genus *Serratia* revisited by genomics. **Nat Commun**. 3;13(1):5195. 2022. doi: 10.1038/s41467-022-32929-2.

WILLIAMSON NR, FINERAN PC, OGAWA W, WOODLEY LR, SALMOND GPC. Integrated regulation involving quorum sensing, a two-component system, a GGDEF/EAL domain protein and a post-transcriptional regulator controls swarming and RhIA-dependent surfactant biosynthesis in *Serratia*. **Environ. Microbiol**. 10:1202–1217. 2008. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01536.x.

World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva: WHO; 2014. Acesso em 09 de outubro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>

Wu LT, Tsou MF, Wu HJ, Chen HE, Chuang YC, Yu WL. Survey of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) among cefotaxime-resistant *Serratia marcescens* at a medical center in middle Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2004 Jun;49(2):125-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.02.004.

WU, Y. M.; HSU, P. C.; YANG, C. C.; CHANG, H. J.; YE, J. J.; HUANG, C. T.; LEE, M. H. *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 46, 259–265. 2013.

YIGITI, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE,

J.W.; STEWARD, C. D. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC- 1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161. 2001.

YOUNG DR, DIVERS TJ, BENSON CE. *Serratia marcescens* septicemia associated with infusion of an amino acid solution in two horses. **J Am Vet Med Assoc**. 195(3):340-2. 1989.

YU, WL, KO, WC, CHENG, KC, CHEN, HE, LEE, CC E CHUANG, YC (2008). Disseminação institucional de isolados de *Serratia marcescens* relacionados clonalmente com uma nova cefalosporinase AmpC (S4): uma experiência de 4 anos em Taiwan. **Diag. Microbiol. Infectar. Des**. 61. 460-467. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.010

YUAN P, D'LIMA NG, SLAVOFF SA. Comparative Membrane Proteomics Reveals a Nonannotated E. coli Heat Shock Protein. **Biochemistry**. 2018 Jan 9;57(1):56-60. 2017. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00864.

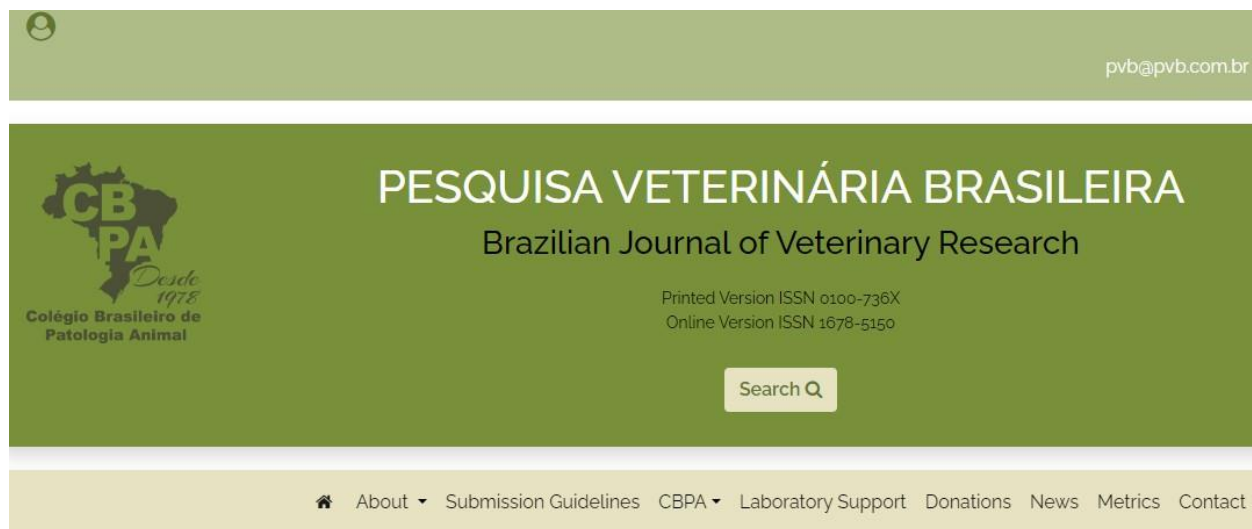
ZHANG, Y.; WANG, Q.; YIN, Y.; CHEN, H.; JIN, L.; GU, B.; XIE, L.; YANG, C.; MA, X.; LI, H.; ZHANG, X.; LIAO, K.; MAN, S.; WANG, S.; WEN, H.; LI, B.; GUO, Z.; TIAN, J.; PEI, F.; LIU, L.; ZHANG, L.; ZOU, C.; HU, T.; CAI, J.; YANG, H.; HUANG, J.; JIA, X.; HUANG, W.; CAO, B.; WANG, H. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: report from the China CRE Network. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. e01882-17. 2018.

8. ANEXO

ARTIGO 3 (Publicado):

Detection of feline panleukopenia virus (*Carnivore protoparvovirus 1*) in free-ranging *Panthera onca* in Brazil

(Relato de Caso proveniente de amostras da rotina dos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular do HOVET-UFMT).



0100-736X	PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA	MEDICINA VETERINÁRIA	A4	MEDICINA VETERINÁRIA
1678-5150	PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE)	MEDICINA VETERINÁRIA	A4	MEDICINA VETERINÁRIA



Detection of feline panleukopenia virus (*Carnivore protoparvovirus 1*) in free-ranging *Panthera onca* in Brazil¹

Thalita P.P.S. Cruz^{2*}, Thais O. Morgado³, Karen R. Ribeiro³,
Luciano Nakazato² and Valéria Dutra²

ABSTRACT. Cruz T.P.P.S., Morgado T.O., Ribeiro K.R., Nakazato L. & Dutra V. 2023. **Detection of feline panleukopenia virus (*Carnivore protoparvovirus 1*) in free-ranging *Panthera onca* in Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 43:e07331, 2023. Laboratório de Microbiologia Veterinária e Biologia Molecular, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil. E-mail: thaly.prii@hotmail.com

The decline in the jaguar population confirms how much the species is vulnerable to extinction in Brazil. It also indicates the degradation of its natural habitat's environmental integrity and quality. Studies claim that large felids are susceptible to feline panleukopenia virus (FPV) and are presumptively diagnosed clinically in Brazil. A free-living jaguar (*Panthera onca*) cub was found unconscious and rescued due to a possible hit-and-run in the savannah of Mato Grosso. During recovery, it exhibited clinical and hematological signs consistent with FPV infection. The PCR was positive for FPV, with 99.61% identity between the FPV sequences available in the GenBank database through the BLAST tool. Due to *habitat* restrictions, certain diseases threaten wild cats and *habitat* encroachment by domestic animals can alter the pattern of spread of pathogens. We highlight the importance of the molecular diagnosis and phylogenetic analysis of FPV to elucidate how it has reached wild felids.

INDEX TERMS: Panleukopenia, jaguar, molecular diagnosis, phylogenetic analysis.

RESUMO. [Detecção do vírus da panleucopenia felina (*Carnivore protoparvovirus 1*) em *Panthera onca* de vida livre no Brasil.] O declínio da população de onça-pintada confirma o quanto a espécie está vulnerável à extinção no Brasil, indicando também a degradação da integridade ambiental e da qualidade de seu *habitat* natural. Estudos afirmam que felinos de grande porte são suscetíveis ao vírus da panleucopenia felina (FPV) e são diagnosticados clinicamente de forma presuntiva no Brasil. Um filhote de onça-pintada (*Panthera onca*) de vida livre foi encontrado inconsciente e resgatado devido a um possível atropelamento no cerrado do Mato Grosso. Durante a recuperação, apresentou sinais clínicos e hematológicos compatíveis com infecção por FPV. A PCR foi positiva para FPV, com 99,61% de identidade entre as sequências de FPV disponíveis

no banco de dados GenBank por meio da ferramenta BLAST. Devido a restrições de *habitat*, certas doenças ameaçam felinos selvagens e a invasão de *habitat* por animais domésticos pode alterar o padrão de propagação de patógenos. Destacamos a importância do diagnóstico molecular e da análise filogenética do FPV para elucidar como ele atinge os felídeos silvestres.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Panleucopenia, onça-pintada, diagnóstico molecular, análise filogenética.

INTRODUCTION

The jaguar is currently considered a species vulnerable to extinction in Brazil, according to the Red Book of Brazilian Fauna (Porfírio 2019). This species is considered an indicator of environmental integrity or quality, as its conservation depends directly on the supply of natural prey and *habitat* quality (Porfírio 2019). Diseases are a growing threat to wild cats due to habitat restriction and encroachment by domestic animals, which can directly or indirectly spread pathogens and alter disease patterns (Furtado & Filoni 2008). Due to the decline in the jaguar population, epidemiological and health studies involving wild animals have been conducted (Silveira et al. 2018).

¹ Received on August 21, 2023.

Accepted for publication on September 6, 2023.

² Laboratório de Microbiologia Veterinária e Biologia Molecular, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil.

*Corresponding author: thaly.prii@hotmail.com

³ Departamento de Clínica Médica de Animais Silvestres, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil

Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) considers both canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV) belonging to the same species, along with mink enteritis virus (MEV) and raccoon parvovirus (RaPV), that have been recently included in the species *Carnivore protoparvovirus 1*, member of the *Protoparvovirus* genus (family Parvoviridae, subfamily Parvovirinae) (Cotmore et al. 2019, Mira et al. 2019).

Carnivore protoparvovirus 1 causes severe enteric disease with a high fatality rate in pets (especially in puppies and young kittens non-immunized), as well as in a wide range of susceptible and endangered wild hosts of extinction (Decaro et al. 2020, Tegegne et al. 2022). Both CPV-2 and FPV have been detected in wild carnivores of different genera across the world, with cross-species transmission at the domestic-wildlife interface still evident in some countries, such as South America, making virus dynamics and evolution rather complex (Santana et al. 2022). Feline panleukopenia is a highly contagious disease caused by the feline panleukopenia virus (FPV), a small, linear, non-segmented, non-enveloped species of feline parvovirus (Rice 2017). The viral genome is a single strand of DNA with tropism in mitotically active tissues (Martins Del Barrio 2016).

The affected young cats present with the classic manifestation of the disease, including intestinal crypts and bone marrow cell depletion, leading to diarrhea that can be hemorrhagic, anorexia, vomiting, and white cell depletion (neutropenia and lymphopenia) (Stuetzer & Hartmann 2014). Direct contact between carnivores is not necessary for efficient transmission (Demeter et al. 2010).

This report addresses the detection of FPV DNA in a jaguar cub, the first molecular diagnosis of FPV in a naturally infected jaguar in Brazil.

CASE REPORT

A jaguar (*Panthera onca*), approximately three months old, was found on the side of the road in the Cerrado of Mato Grosso, suspected to have been run over. The animal was rescued, referred for emergency evaluation, and received symptomatic treatment based on suspicion of cranioencephalic and abdominal trauma. Following an improved state of consciousness, the animal presented with a seizure controlled by diazepam administration and treated with phenobarbital.

The animal was then referred to a tertiary veterinary hospital, where CSF and blood samples were collected for hematological, cytological, and molecular tests for canine distemper virus, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Coccidioides* spp. as well as serological tests for distemper, leishmaniasis, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV). All tests were negative.

Approximately two months after the rescue, the animal was apparently healthy with no laboratory abnormalities and was thus transferred to a larger enclosure for its well-being. In this area, the presence of stray domestic animals is observed in the neighborhood, and three weeks after transfer to the enclosure, the animal presented with anorexia, emesis, diarrhea, and stereotyped pacing behavior. Blood count revealed severe leukopenia (300 leukocytes/mm³), preventing the white cells' differential count. The symptoms were consistent with feline panleukopenia; therefore, whole blood and rectal swab

samples were collected for the molecular diagnosis of FPV. The following day, the animal died and was referred for necropsy.

Necropsy revealed alterations suggestive of parvovirus infection, such as dehydration, anemia, distended segments of intestinal loops, with evident vascularization on the serous surface, thickened mucosa with a slightly yellowish granular appearance (Fig.1). It was also observed enteritis, multifocal crypt necrosis, moderate infiltration of mononuclear cells, shortening of intestinal villi, and lymphoid depletion. In the CNS, the encephalic meninges were opaque with an edematous appearance characterized by flattened gyri and thinned sulci. The frontal, parietal, and occipital cortices exhibited polioencephalomalacia (cerebrocortical necrosis) (Fig.2). Microscopically, severe depletion of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), diffuse and marked necrotic enteritis



Fig.1. Macroscopic alterations observed in the jaguar's gastrointestinal system (intestine) affected by feline panleukopenia. Distended segments of intestinal loops, with evident vascularization on the serous surface, thickened mucosa, with a slightly yellowish granular appearance.



Fig.2. Brain. Macroscopic alterations observed in the central nervous system of the jaguar affected by feline panleukopenia. Meninges were opaque with an edematous appearance characterized by flattened gyri and thinned sulci.

with necrosis of crypt cells, fusion and flattening of villi and submucosal edema was observed in the small intestine (Fig.3).

According to the manufacturer's instructions, DNA extraction from the rectal swab was performed using the MagMAX Sample Extraction Kit (Thermo Fisher[®]). PCR was performed using oligonucleotides 5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACC-3' and 5'-GGATCACCACCTGCTGCTTG-3', as described by Yoon et al. (2009), which amplifies an 1127bp fragment (a gene that encodes a fragment of the VP2 viral capsid protein) and ultrapure water used as a negative control.

The reactions were performed in a thermocycler (SimpliAmp Thermo Cycler, Thermo Fischer Scientific[™]) as described by Yoon et al. (2009). The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, stained with GelRed[™] (Nucleic Acid Gel stain, Biotium[®]) at 10V/cm, and visualized in a ChemiDoc[™] XRS photodocumenter using Image Lab[™] software to verify the results. The molecular mass marker used was ladder 100bp (Ludwig[®]). Obtaining the specific PCR product for the gene that encodes a fragment of the VP2 viral capsid protein at the height of 1,127bp, according to the positive control used in the reaction, confirmed the detection of feline parvovirus in the tested sample, indicating, thus, feline panleukopenia.

The product obtained by PCR was purified using the GE Healthcare Illustra GFX[™] Kit and used in the sequencing reaction, together with BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems) in the automatic sequencer ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequence was matched and deposited (GenBank MZ883094) in the GenBank database using BLAST on the NCBI server⁴, showing 99.61% similarity with the FPV (MF541125 GenBank) and phylogenetic analysis corroborated this sequence as FPV group. Phylogenetic analysis was performed by comparing g nucleotide sequences with other parvoviruses using software

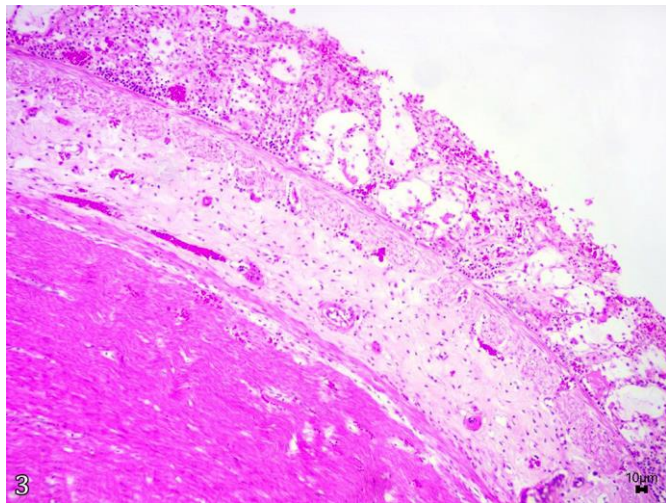


Fig.3. Intestine. Severe depletion of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), diffuse and marked necrotic enteritis with necrosis of crypt cells, fusion and flattening of villi and submucosal edema. HE, obj.10x.

(Muscle) and phylogenetically analyzed using PhyML⁵ and tree design in iTol⁶ (Fig.4).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The clinicopathological correlation of the histopathological findings associated with the detection of FPV by complementary exam (PCR) was compatible with an infection of FPV. Several clinical and serological studies have confirmed that large felids are more susceptible to FPV. The animal was approximately six months old in the present case, corroborating the literature that mentions that FPV affects young domestic and wild felids (Duarte et al. 2009, Castro et al. 2014, Barrs 2019).

The gastrointestinal clinical signs, anorexia, and blood count findings the day before death are also consistent with the literature, as described by Castro et al. (2014) and Stuetzer & Hartmann (2014), who reported that young infected animals manifest the classic form of the disease, presenting with depletion of intestinal crypts and bone marrow cells, leading to diarrhea, anorexia, vomiting, and depletion of white cells. According to Truyen et al. (2009), PCR can be conducted utilizing blood or feces, with the preference for blood usage in cats lacking diarrhea symptoms. For the current research, the decision was made to employ a rectal swab for PCR, given the recent manifestation of distinct diarrhea symptoms in the animal.

Necropsy revealed pathological changes suggestive of parvovirus infection in the intestine, as described in previous literature (Demeter et al. 2010, Stuetzer & Hartmann 2014). It was not possible to determine the specific etiology of laminar polioencephalomalacia. However, this alteration may be directly or indirectly associated with thiamine deficiency in carnivores, although lesions were not observed in anatomical locations specific to this etiology, such as in histological sections of the caudal colliculus (Sykes 2013, Maxie 2016, Zachary 2017, Terio et al. 2018).

Vaccines have reduced the frequency of FPV infection in urban domestic cats, but the virus persists in the outskirts

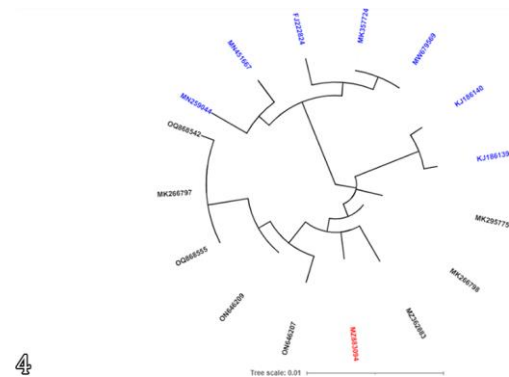


Fig.4. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the VP2 gene of feline panleukopenia virus – FPV (black) and canine parvovirus – CPV (blue) based Muscle alignment software, PhyML⁵ and tree design in iTol⁶. The Jaguar sequence is red.

⁴ Available at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>> Accessed on Oct. 24, 2022.

⁵ Available at <www.phylogeny.fr> Accessed on Aug. 17, 2023.

⁶ Available at <itol.embl.de> Accessed on Aug. 17, 2023.

due to strays and limited resources. Wild cats are at risk when interacting with strays from these areas (Day et al. 2016). Wild felids are at a higher risk of exposure when they meet stray animals from urban outskirts, as in the study of Duarte et al. (2009), where a phylogenetic analysis of FPV strains from Lisbon domestic cats demonstrated striking similarity to strains found in tigers and lions.

In Brazil, cases of FPV occasionally occur in institutions that keep wild felids in captivity, with only a presumptive clinical diagnosis being made (Filoni 2006). Molecular diagnosis is essential because of its high sensitivity and specificity. Canine parvovirus (CPV) can be isolated from healthy and diseased cats (Stuetzer & Hartmann 2014). However, only 5% of feline panleukopenia cases are caused by CPV variants, specifically CPV-2a, b, and c (Barrs 2019).

The surveillance of roadkill and collected wildlife serves as an indicator of instances involving and exposing wild animals to the FPV and its variants. Such occurrences can arise due to the encroachment of domestic animals into natural habitats, rendering these creatures more vulnerable to diseases and vehicle collisions.

This study's primary limitations involve presenting findings from a single case of a wild animal, from which we procured and analyzed merely a partial sequence. The sequenced fragment spanned 1,022bp and was localized within the VP2 capsid protein region of the parvovirus, impeding a more precise depiction of the prevalence and influence of FPV in these creatures. Furthermore, there was no data on *Protoparvovirus 1* molecular characterization of stray animals (dog and cat) in the city, which hampered a complete association with the infection source.

Another issue is the infection timeline since clinical signs begin after rehabilitation enclosure, but infection during hospitalization cannot be ruled out. These environments must implement rules to avoid direct and indirect contact with domestic animals that may carry infectious agents and transmit them to wild animals undergoing treatment. It is necessary to implement stricter measures to prevent possible contact between these animals and potential carriers of FPV.

Conflict of interest statement.- The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Barrs V.R. 2019. Feline panleukopenia: A re-emergent disease. *Vet. Clin. N. Am., Small Anim. Pract.* 49(4):651-670. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.006> <PMid:30967253>
- Castro N.B., Rolim V.M., Hesse K.L., Oliveira E.C., Almeida P.R., Wouters A.T.B., Driemeier D. & Sonne L. 2014. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em felinos domésticos com panleucopenia felina. *Pesq. Vet. Bras.* 34(8):770-775. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800011>
- Cotmore S.F., Agbandje-McKenna M., Canuti M., Chiorini J.A., Eis-Hubinger A.-M., Hughes J., Mietzsch M., Modha S., Ogliastro M., Pénzes J.J., Pintel D.J., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P. & Tijssen P. 2019. Ictv Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* 100(3):367-368. <https://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001212> <PMid:30672729>
- Day M.J., Horzinek M.C., Schultz R.D. & Squires R.A. 2016. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. *J. Small Anim. Pract.* 57:699-706. Available at <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/WSAVA-vaccination-guidelines-2015-Portuguese.pdf> Accessed on Aug. 2, 2023.
- Decaro N., Buonavoglia C. & Barrs V. 2020. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: are we far from disease eradication? *Vet. Microbiol.* 247:108760. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760> <PMid:32768213>
- Demeter Z., Palade E.A. & Rusvai M. 2010. Feline panleukopenia virus infection in various species from Hungary. *Lucr. St. Med. Vet.* 43(1):73-81.
- Duarte M.D., Barros S.C., Henriques M., Fernandes T.L., Bernardino R., Monteiro M. & Fevereiro M. 2009. Fatal infection with feline panleukopenia virus in two captive wild carnivores (*Panthera tigris* and *Panthera leo*). *J. Zoo Wildl. Med.* 40(2):354-359. <https://dx.doi.org/10.1638/2008-0015.1> <PMid:19569486>
- Filoni C. 2006. Exposição de felídeos selvagens a agentes infecciosos selecionados. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. 126p. <https://dx.doi.org/10.11606/T.10.2006.tde-26012007-171939>
- Furtado M.M. & Filoni C. 2008. Diseases and their role for jaguar conservation. *Cat News Special Issue* (4):35-40.
- Martins Del Barrio M.A. 2016. Doenças infectocontagiosas, p.693-698. In: Mazzotti G.A. & Roza M.R. (Eds), *Medicina Felina Essencial*. Equalis, Brasil.
- Maxie M.G. 2016. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 1. 6th ed. Elsevier, St. Louis.
- Mira F., Purpari G., Di Bella S., Colaianni M.L., Schirò G., Chiaramonte G., Gucciardi F., Pisano P., Lastra A., Decaro N. & Guercio A. 2019. Spreading of canine parvovirus type 2c mutants of Asian origin in southern Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 66(6):2297-2304. <https://dx.doi.org/10.1111/tbed.13283> <PMid:31254456>
- Porfírio G. 2019. Etnozootologia e conservação da onça-pintada (*Panthera onca*) no Brasil. *Interações*, 20(2):559-574. <https://dx.doi.org/10.20435/inter.voio.1717>
- Rice J.K. 2017. Successful treatment of feline panleukopenia: a guideline for rescuers and veterinarians, part I. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* 6(2). <https://dx.doi.org/10.4172/2325-9590.1000223>
- Santana W.O., Silveira V.P., Wolf J.M., Kipper D., Echeverrigaray S., Canal C.W., Truyen U., Lunge V.R. & Streck A.F. 2022. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 98:105225. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105225> <PMid:35101636>
- Silveira M.M., Candido S.L., Dutra V., Miyazaki S.S. & Nakazato L. 2018. Detection of noroviruses in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) in the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Arch. Virol.* 163(7):1961-1963. <https://dx.doi.org/10.1007/s00705-018-3789-7> <PMid:29516245>
- Stuetzer B. & Hartmann K. 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet. J.* 201(2):150-155. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.027> <PMid:24923754>
- Sykes J.E. 2013. Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier Health Sciences. p.187-194. <https://dx.doi.org/10.1016/C2009-0-41370-9>
- Tegegne D., Tsegaye G., Faustini G. & Franzo G. 2022. First genetic detection and characterization of canine parvovirus type 2 (*Carnivore protoparvovirus 1*) in southwestern Ethiopia. *Vet. Res. Commun.* 47(2):975-980. <https://dx.doi.org/10.1007/s11259-022-10027-4> <PMid:36322244>
- Terio K.A., McAloose D. & Leger J.St. 2018. Pathology of Wildlife and Zoo Animals. Elsevier, p.263-283. <https://dx.doi.org/10.1016/C2015-0-01586-6>
- Truyen U., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Hosie M.J., Lloret A., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M.G., Radford A.D., Thiry E. & Horzinek M.C. 2009. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11(7):538-546. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.002> <PMid:19481033>
- Yoon S.H., Jeong W., Kim H.-J. & An D.-J. 2009. Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: A Bayesian approach. *Arch. Virol.* 154(8):1353-1360. <https://dx.doi.org/10.1007/s00705-009-0444-3> <PMid:19590812>
- Zachary J.F. 2017. Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult. 6th ed. Elsevier. 1408p. (E-book ISBN: 978-0-323-35775-3).