

# Comparação do mecanismo de heterorresistência em *Serratia marcescens* por *time kill curve* frente ao meropeném

## Comparison of heteroresistance mechanism in *Serratia marcescens* by *time kill curve* against meropenem

Hortência Biatriz de Melo Santana<sup>1</sup>, Andréa de Souza Monteiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biomédica pela Universidade Ceuma. São Luís, MA, Brasil.

<sup>2</sup> Professora pesquisadora vinculada ao Programa de Mestrado em Biologia Microbiana da Universidade Ceuma. São Luís, MA, Brasil.

### Resumo

*Serratia marcescens* pertence à Família *Enterobacteriaceae*, é Gram-negativa e anaeróbica facultativa, sendo bem distribuída na natureza; pode ser isolada como saprófita do solo e da água. Possui um significado clínico relevante, pois acarreta infecções nosocomiais e pulmonares em determinados setores da saúde, como unidades neonatais, maternidades e UTIs, além de sepse, meningite, choque endotóxico e infecções do trato urinário. O intuito desse estudo foi analisar o mecanismo de heterorresistência em linhagens sensíveis de *Serratia marcescens* diante das concentrações testadas de meropeném. As linhagens SR1 e SR2 apresentaram perfil heterorresistente, ao passo que a SR6 demonstrou ser não heterorresistente, com CIM elevado (32 µg/mL). Os isolados de *Serratia marcescens* são suscetíveis ao meropenem, por testes de sensibilidade padrão, mas contêm subpopulações resistentes ao mesmo.

**Palavras-chave:** Bactérias Gram-Negativas; Biologia Celular; *Enterobacteriaceae*; Enterobacteriáceas Resistentes a Carbapenênicos

### Abstract

*Serratia marcescens* belongs to the *Enterobacteriaceae* family, it is optional anaerobic gram-negative, being well distributed in nature and it might be isolated as saprophytic from soil and water. It has a meaningful clinical significance, because it causes nosocomial and lung infections in certain healthcare sectors, such as neonatal units, maternity units and UTIs; septicemia, meningitis, endotoxin shock and urinary tract infections. The aim of this study was to analyze the mechanism of heteroresistance in susceptible strains of *Serratia marcescens* in the presence of the tested concentration of meropenem. The lineages SR1 and SR2 presented heteroresistant profile, while the SR6 showed to be nonheteroresistente, with CIM (32 µg/mL). The Isolates of *Serratia marcescens* are susceptible to meropenem, by standard sensitivity testing, but there are subpopulations resistant to it.

**Keywords:** Gram-Negative Bacteria; Cell Biology; *Enterobacteriaceae*; Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*

Correspondência

**Hortência Biatriz de Melo Santana**

Universidade Ceuma - Campus Renascença

Rua Josué Montello, nº 1, Renascença II

São Luís-MA - CEP 65.075-120

E-mail: bmd.hortencia@gmail.com

Recebido em 13/10/2020 | Aprovado em 23/09/2021 | DOI: 10.21877/2448-3877.202102071

## 1. INTRODUÇÃO

*Serratia marcescens* pertence à Família *Enterobacteriaceae*, é Gram-negativa e anaeróbica facultativa, sendo bem distribuída na natureza e podendo ser isolada como saprófita do solo e da água.<sup>(1)</sup> Possui significado clínico relevante, pois acarreta infecções nosocomiais e pulmonares em determinados setores da saúde, como unidades neonatais, maternidades e Unidade de Terapia Intensiva (UTI), além de sepse, meningite, choque endotóxico e infecções do trato urinário, por ser considerada uma bactéria oportunista em recém-nascidos, imunocomprometidos e pacientes intensivos, podendo estar presente em fontes contaminadas como soluções de infusão, desinfetantes, equipamentos médicos como broncoscópicos e laringoscópicos, ou mãos dos profissionais de saúde.<sup>(2,3)</sup>

O número de infecções causadas por *Serratia marcescens* tem aumentado em razão do desenvolvimento da resistência adquirida a diversos fármacos antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, e por apresentar resistência intrínseca a alguns fármacos como, por exemplo, penicilinas, cefalosporinas, nitrofurantoína, macrólidos e colistina, proporcionando resultados que têm despertado o interesse pela pesquisa de linhagens multirresistentes a medicamentos (MDR – *Multi-drug-Resistant*).<sup>(4)</sup>

A resistência aos fármacos antimicrobianos foi descrita pela primeira vez em 1947 em bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenzae* e, quase 20 anos mais tarde, para estafilococos Gram-positivos.<sup>(5)</sup>

Mesmo com a diminuição no número de fármacos antimicrobianos ativos contra bactérias multirresistentes nas últimas três décadas, o meropeném está entre as primeiras escolhas nas infecções causadas por bactérias Gram-negativas pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Moraxellaceae*, por exemplo, e no tratamento empírico de infecções graves. Para alguns autores, o meropeném é um fármaco antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos que possui amplo espectro de atividade antibacteriana.<sup>(6,7)</sup>

Diante disso, a resistência a determinado fármaco pode ser desencadeada por fenômenos de resistência específicos como a heterorresistência, que é definida pela presença de subpopulações resistentes dentro de uma população maior de microrganismos totalmente sensíveis a antimicrobianos.<sup>(8)</sup>

No entanto, o primeiro relato do termo “heterorresistência” data de 1970 e pode ser referida como “resistência heterogênea”, “variação de resistência em toda a população” e “heterogeneidade de resposta a fármaco antimicrobiano”.<sup>(5)</sup>

Estas subpopulações advêm do crescimento bacteriano em meio de cultura contendo concentrações de fármacos antimicrobianos superiores às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) iniciais do isolado, podendo também ser encontradas numa população sensível, subpopulações com CIMs superiores às concentrações originais, entretanto estes valores não indicam resistência, e sim heterogeneidade.<sup>(8)</sup>

Nesse contexto, são importantes pesquisas voltadas às linhagens em que, mesmo apresentando CIMs que as classificam como sensíveis a um determinado fármaco antimicrobiano, são detectadas subpopulações resistentes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Proveniência e identificação das amostras

As amostras das linhagens sensíveis de *Serratia marcescens* foram cedidas pelo Laboratório Cedro, localizado em São Luís-MA. A identificação dos isolados bacterianos foi realizada pelo sistema Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass. 31 Spectrometry (MALDI-TOF MS).

### 2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para o meropenem

Para os testes de seleção de clones heterorresistentes foi utilizado o método de evolução direta proposto, com modificações.<sup>(9)</sup>

Para os ensaios da CIM, foi utilizado o método da microdiluição em Caldo Muller Hinton (Difco, Detroit, MI, USA) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016), utilizando a placa de 96 poços (Kasvi).<sup>(8)</sup>

Para execução desse procedimento, foram utilizados os clones obtidos na concentração 1024µg/mL de meropeném das 3 linhagens bacterianas e ativados em *overnight* (24 horas) em meio Ágar Muller Hinton (Difco, Detroit, MI, USA) a 37°C. Após a incubação, as bactérias foram diluídas em salina (NaCl a 0,85%), ajustada na escala de McFarland 0,5 (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). O antibiótico meropeném foi preparado na concentração de 1024µg/mL de meropeném diluído em 5mL de Caldo Muller Hinton, filtrado em membrana estéril 0,22µm (Milipore Co., Bedford, MA, EUA) acoplada à seringa.

Seguiu-se então o preparado das placas, onde foi colocado em cada poço 100µL do Caldo Muller Hinton, depois mais 100µL do meropeném correspondente, 5µL do inóculo bacteriano e feita a diluição seriada, descartando 100 µL para obter um volume final de 100µL e uma concentração de 10<sup>4</sup> células/mL. Após o preparo das placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, os poços

foram monitorados para determinação da CIM pelo método visual de crescimento de bactérias.

As concentrações testadas foram: 2X CIM, 1X CIM, 0,5X CIM, 0,250X CIM, 0,125X CIM, 0,06125X CIM e 0,03125X CIM para SR1 e SR2; 512X CIM, 256X CIM, 128X CIM, 64X CIM, 32X CIM, 16X CIM, 8X CIM e 4X CIM para SR6.

### 2.3 Ensaios de curva de tempo-morte (*time kill curve*) para o meropenem

Para a análise da curva de tempo-morte foram testadas diferentes concentrações de meropeném, nos clones de *S. Marcescens* que foram isolados a 1024µg/mL. Essas concentrações foram 0,06125X CIM, 0,03125X CIM, 0,01625X CIM, 16X CIM, 32X CIM e 64X CIM, equivalendo a uma ordem crescente da concentração de meropeném de 0,01625µg/mL; 0,03125µg/mL; 0,06125µg/mL para SR1 e SR2 e 16 µg/mL, 32 µg/mL e 64 µg/mL para SR6.

O inóculo foi preparado a partir da diluição da bactéria em salina, ajustada na escala de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida foram preparados os tubos de crescimento bacteriano para as concentrações testadas e incubados a 37°C na estufa bacteriológica.

Após esse processo, foram adicionados 900µL de salina (NaCl a 0, 85%) em 9 microtubos eppendorfs e adicionado 100µL da respectiva bactéria para realizar a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ). Após esta etapa, foi realizada a inoculação da amostra por microgota, retirando 10µL dos microtubos eppendorfs respectivos às linhagens testadas, com as seguintes diluições:  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$  para o plaqueamento e montagem da curva de tempo-morte. As colônias foram quantificadas em  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL e plotadas em gráfico logarítmico. Esta quantificação foi utilizada para estimar a viabilidade celular dos clones tolerantes, obtidos a partir de 1024µg/mL de meropeném, até o tempo de 24 horas nas seguintes concentrações: 0,06125X CIM; 0,03125X CIM e 0,01625X CIM; 16X CIM; 32X CIM e 64X CIM.

Este procedimento foi realizado para cada tempo da curva, sendo os tempos analisados: 4 horas, 8 horas, 12 horas e 24 horas.

### 2.4 Aspectos Éticos

A presente pesquisa seguiu os preceitos éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde através da Resolução nº 466/12 que trata direta e indiretamente a pesquisa com seres humanos. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Ceuma, sob o Parecer nº 34939614.1.0000.5084.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Perfil de sensibilidade da *Serratia marcescens* ao meropeném

Os três isolados de *S. marcescens* SR1, SR2 e SR6 foram suscetíveis ao meropeném. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram 0,03µg/mL, 0,03µg/mL e 32µg/mL, respectivamente.

### 3.2 Curva de tempo-morte (*time kill curve*) para meropeném em isolados de *Serratia marcescens*

As linhagens SR1 e SR2, com perfil de heterorresistência, apresentaram viabilidade nas concentrações 0,06125X CIM, 0,03125X CIM e 0,01625X CIM até 8 horas expostos ao antibiótico, no entanto não houve crescimento celular (no tempo de 12 h) até o término do período experimental. Por outro lado, a linhagem SR6, mais resistente, demonstrou viabilidade nas concentrações 16X CIM, 32X CIM e 64X CIM até 12 horas, entretanto não houve crescimento bacteriano ao completar 24 horas.

O comportamento do isolado *S. marcescens* SR1 heterorresistente demonstrou crescimento em todas as concentrações nas primeiras 4 horas com contagens de 2,34  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,06125X CIM), 2,47  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,03125X CIM) e 2,95  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,01625X CIM). Em 8 horas de experimento houve diminuição (0,06125X CIM e 0,03125X CIM) das colônias e permanência das mesmas (0,01625X CIM) com as quantidades equivalendo a 2,14  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL, 2,36  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL e 2,95  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL, respectivamente. No entanto, ao completar 12 horas e 24 horas não houve mais crescimento bacteriano observável.

Por outro lado, o comportamento da linhagem *S. marcescens* SR2, também heterorresistente, apresentou colônias em 4 horas nas quantidades 2,14  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,06125X CIM), 2,32  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,03125X CIM) e 2,44  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,01625X CIM). E no tempo de 8 horas observou-se um aumento em todas as concentrações testadas, equivalendo a 2,47  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,06125X CIM), 2,69  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,03125X CIM) e 2,77  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (0,01625X CIM). Contudo, no tempo de 12 horas e 24 horas não houve crescimento bacteriano observável.

Em contrapartida, a linhagem *S. marcescens* SR6 apresentou maior crescimento nas primeiras 4 horas de 3,4  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (16X CIM), 2,8  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (32X CIM) e 2  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (64X CIM); após 8 horas houve um declínio do crescimento (16X CIM e 32X CIM), obtendo como contagem as seguintes quantidades: 2  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL (16X CIM), 2,3  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL

(32X CIM), respectivamente, e 2 Log<sub>10</sub> UFC/mL (64X CIM). Já no tempo de 12 horas observou-se um pequeno aumento de células viáveis em todas as concentrações testadas, a saber: 2,11 Log<sub>10</sub> UFC/mL (16X CIM), 2,60 Log<sub>10</sub> UFC/mL (32X CIM) e 3 Log<sub>10</sub> UFC/mL (64X CIM). No tempo de 24 horas de período experimental não houve mais crescimento bacteriano observável.

Os isolados de subpopulações tolerantes de *S. marcescens* SR1 e *S. marcescens* SR2 comparadas na curva de tempo-morte mostraram um perfil semelhante até o tempo de 4 horas de ensaio. Estas linhagens também apresentaram um perfil de suscetibilidade ao meropeném após 12 horas de crescimento, sendo evidenciada a morte da cultura após este tempo, demonstrada pela perda de viabilidade celular. Tanto *S. marcescens* SR1 quanto *S. marcescens* SR2 apresentam um perfil heterorresistente devido ao retorno da suscetibilidade a CIM inicial ao meropeném, ao passo que a *S. marcescens* SR6, isolado não heterorresistente, com características de persistente, apresentou maior nível de crescimento com sobrevivência por até 12 horas nas concentrações testadas, em comparação com as linhagens heterorresistentes SR1 e SR2. No entanto, houve a morte da população, perda de 100% da viabilidade, no tempo final de 24 horas.

#### 4. DISCUSSÃO

Diante da análise feita nesse estudo, esses resultados podem ser comparados com Cherkaoui et al.<sup>10</sup> ao ter evidenciado a heterorresistência ao antibiótico imipeném em isolados clínicos de *Haemophilus influenzae*, bactéria Gram-negativa oportunista, porém esta espécie tem sido raramente descrita frente a esse mecanismo. Vale ressaltar que a heterorresistência ao meropeném foi pela primeira vez detectada em *Staphylococcus* resistentes à metilina.<sup>(11)</sup>

Também foram encontrados resultados semelhantes de heterorresistência, em que foram comparados por curva de tempo-morte<sup>(12)</sup> ao relatar a análise de subpopulações resistentes de *K. pneumoniae* frente à colistina (polimixina E).

Com relação a bactérias Gram-negativas, poucos são os estudos que avaliam a heterorresistência desses microrganismos aos antibióticos carbapenêmicos, como meropeném e imipeném. A espécie mais estudada é *K. pneumoniae*.<sup>(13)</sup> Adams-Sapper et al.<sup>(13)</sup> reportaram que linhagens de *K. pneumoniae*, produtoras da enzima KPC e heteroresistentes sobrevivem a concentrações bactericidas de imipeném de 8 a 32 vezes mais altas do que as linhagens selvagens. Os autores associaram a sobrevivência das células bacterianas a

uma alta densidade celular (resistência ao imipeném de alto nível) sem aumento da expressão do gene *bla*<sub>KPC</sub>.

Existem debates na comunidade científica sobre a relação de linhagens bacterianas heterorresistentes e sua associação ao fracasso do tratamento clínico com fármacos antibacterianos.<sup>(14-15)</sup> No entanto, neste estudo foi observado que o uso de uma monoterapia com meropeném *in vitro* para *S. marcescens*, que apresenta inicialmente um perfil sensível, pode exibir uma elevação da densidade populacional culminando na formação de subpopulações resistentes em concentrações crescentes de meropeném, e que, possivelmente, em uma situação clínica esse fenômeno poderia ocorrer, especialmente em sítios de infecção em que a densidade bacteriana pode ser alta, e a penetração de fármacos subótima pode involuntariamente levar à indução de resistência bacteriana e falha do tratamento.

#### 5. CONCLUSÃO

Portanto, os isolados de *S. marcescens* que são suscetíveis ao meropeném, por testes de sensibilidade padrão, apresentaram subpopulações resistentes ao mesmo, cujas subpopulações são selecionadas diante de concentrações crescentes de meropeném. Sendo assim, os isolados SR1 e SR2 são heterorresistentes, pois retornaram à sua CIM inicial (0,03µg/mL), ao passo que o isolado SR6 é não heteroresistente, pois não retornou à sua CIM inicial (2µg/mL), mas apresentou uma CIM elevada, de 32µg/mL.

#### 6. REFERÊNCIAS

1. González-Juarbe N, et al. Requirement for *Serratia marcescens* cytolysin in a murine model of hemorrhagic pneumonia. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 2, p. 614-624, 2015. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/83/2/614.full> >. Acesso em: 22 ago. 2017.
2. Dasgupta S, et al. A case report on *Serratia marcescens*. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, v.5, n.75, p. 5603-5605, 2016. Disponível em: < [https://jemds.com/latest-articles.php?at\\_id=11891](https://jemds.com/latest-articles.php?at_id=11891) >. Acesso em: 18 ago. 2017.
3. Schuppener LM, et al. *Serratia marcescens* Bacteremia: Nosocomial Cluster Following Narcotic Diversion, v. 38, n. 9, p. 1027-1031, 2017. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/ice.2017.137> >. Acesso em: 22 ago. 2017.
4. Moradigaravand D, et al. Recent independent emergence of multiple multidrug – resistant *Serratia marcescens* clone within the United Kingdom and Ireland, v. 26, n. 8, p. 1101-1109, 2016. *Genome Research*. Disponível em: < <http://genome.cshlp.org/content/26/8/1101> >. Acesso em: 28 ago. 2017.
5. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 1, p. 191-207, 2015. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/28/1/191> >. Acesso em: 4 abr. 2017.

6. Kongthavonsakul K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in children with severe infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 2, p. 151-157, 2016. Disponível em: < [http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(16\)30116-9/fulltext](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(16)30116-9/fulltext) >. Acesso em: 3 set. 2017.
7. Kong L, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of meropenem KONG, L. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of meropenem for the treatment of nosocomial pneumonia in intracerebral hemorrhage patients by monte carlo simulation. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 1, n. 1:1060028017719715, p. 1-6, 2017. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1060028017719715> >. Acesso em: 4 set. 2017.
8. Luz, Daniela Inocente. Heterorresistência e resistência adaptativa à polimixina B em isolados de enterobacteriaceae produtores de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC). Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/115008> >. Acesso em: 3 fev. 2017.
9. Oz T, et al. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution, v. 31, n. 9, p. 2387-2401, 2014. *Molecular Biology and Evolution*. Disponível em: < doi: 10.1093/molbev/msu191 >. Acesso em: 18 nov. 2017.
10. Cherkaoui A. et al. Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation, v. 23, n. 2, p. 118 e 9-118 e 19, 2017. *Clinical Microbiology and Infection*. Disponível em: <doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.009>. Acesso em: 15 abr.2018.
11. Kayser FH, et al. Activity of meropenem, against gram-positive bacteria, v. 24, p. 101-112, 1989. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808202> >. Acesso em: 20 nov. 2017.
12. Band VI, et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibiting clinically undetected colistin heteroresistance leads to treatment failure in a murine model of infection, v. 9, n. 2, p.1-6, 2018. *American Society for Microbiology*. Disponível em: < doi: 10.1128/mBio.02448-17 >. Acesso em: 10 abr. 2018.
13. Adams-Sapper S, et al. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, v. 59, n. 6, p. 3281-3289, 2015. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Disponível em: 10.1128/AAC.05100-14>. Acesso em: 24 maio. 2018.
14. Falagas M, et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance?, v. 14, n. 2, p. 101-104, 2008. *Clinical Microbiology and Infection*. Disponível em: < 10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x >. Acesso em: 24 maio. 2018.
15. Satola SW, et al. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method, v. 49, n. 1, p. 177-183, 2011. *Journal of Clinical Microbiology*. Disponível em: < doi: 10.1128/JCM.01128-10 >. Acesso em: 24 maio. 2018.